

Charakterisierung der Wirkung von Bradykinin an Neuronen des Plexus submucosus aus dem Colon der Ratte

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie & Chemie
(Fachgebiet Biologie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Janine Verena Avemary
aus Frankfurt am Main

Gießen, 2010

angefertigt am Institut für Veterinär-Physiologie des Fachbereichs
Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan des Fachbereichs

Biologie und Chemie: Prof. Dr. V. Wolters

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Clauß

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der Disputation: 25.03.2010

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ACh	Acetylcholin
AH	Afterhyperpolarization
AM	Acetoxymethylester
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B1-Rezeptor	Bradykinin B1-Rezeptor
B2-Rezeptor	Bradykinin B2-Rezeptor
Bk	Bradykinin
BSA	bovines Serumalbumin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
Ca _v -Kanäle	spannungsabhängige Ca ²⁺ -Kanäle
CCD	Charge coupled device
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol Dilactat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-n,n,n',n'-Tetraessigsäure
ENS	enterisches Nervensystem
ER	endoplasmatisches Reticulum
FKS	fetales Kälberserum
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GIRK	G-Protein gekoppelte K ⁺ -Kanäle

Gt	Gewebeleitfähigkeit
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMW	High molecular weight
HVA	High voltage activated
IgG	Immunglobulin g (= Antikörper)
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
Isc	Kurzschlussstrom
IV-Kurve	Strom-Spannungskurve
Kd	Dissoziationskonstante
KGluc	Kaliumgluconat
Kir	Inwardly-rectifying potassium channels
LMW	Low molecular weight
LVA	Low voltage activated
M-Rezeptor	Muskarinerge Acetylcholin Rezeptor
N-Rezeptor	Nicotinerge Acetylcholin Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NMDG	N-Methyl-d-Glucamin
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung
PFA	Paraformaldehyd
PGP 9.5	Protein gene product 9.5
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
ROI	Region of interest
rpm	Rotationen pro Minute

RT	Raumtemperatur
S.E.M.	Standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	sarco-endoplasmatisches Reticulum-Ca ²⁺ -ATPase
t _{1/2}	Halbwertszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
VIP	Vasointestinales Peptid
Vol/Vol	Volumenanteil (Volumen/Volumen)
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
1 Der Plexus submucosus als Teil des enterischen Nervensystems.....	1
2 Der Entzündungsmediator Bradykinin.....	2
3 Intrazelluläre neuronale Prozesse.....	4
4 Fragestellung und Ziele der Arbeit	6
 II Material und Methoden	 8
1 Versuchstiere.....	8
2 Lösungen	8
2.1 Lösungen für immunhisto- und immuncytochemische Markierungen	8
2.1.1 Phosphatpuffer (PBS)	8
2.1.2 Fixierungslösung.....	8
2.1.3 Blockierungslösungen	9
2.1.4 Primärantikörperlösungen	9
2.1.5 Sekundärantikörperlösungen	9
2.1.6 DAPI-Lösung	9
2.2 Lösungen für die Ca^{2+} -Imaging-Messungen	9
2.2.1 Standard-Tyrodelösung	9
2.2.2 Fura-2 AM-Lösung	10
2.2.3 Ca^{2+} -freie Tyrodelösung	10
2.3 Lösungen für die Patch-Clamp-Messungen	10
2.3.1 Standard-Tyrodelösung	10
2.3.2 Standard-Pipettenlösung	10
2.4 Lösung für die Ussingkammer-Messungen	11
2.4.1 Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung	11
2.5 Lösung für die Isolation des Plexus submucosus	11
2.6 Lösungen für die submucöse primäre Zellkultur	11
2.6.1 Isolationslösung	11
2.6.2 Enzymatische Digestionslösung	11
2.6.3 Zellkulturmedium	11

2.7	Lösungen zur Beschichtung der Glasplättchen	12
2.7.1	Poly-L-Lysin-Lösungen	12
3	Substanzen	12
4	Beschichtung der Glasplättchen	13
5	Gewebepräparation	14
5.1	Herstellung der Submucosa-Mucosa-Präparate	14
5.2	Herstellung der Submucosa-Präparate (intakte Häutchenpräparate des Plexus submucosus)	14
6	Primäre Zellkultur des Plexus submucosus	16
6.1	Enzymatischer Verdau der Submucosa	16
7	Ca ²⁺ -Imaging	18
7.1	Theorie des Ca ²⁺ -Imagings	18
7.2	Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2	19
7.3	Der Ca ²⁺ -Imaging-Messstand	21
7.4	Die Imaging-Messkammer mit Perfusionsystem	22
7.5	Durchführung und Auswertung der Ca ²⁺ -Messungen	22
8	Patch-Clamp-Technik	25
8.1	Grundlagen der Patch-Clamp-Technik	25
8.1.1	Verschiedene Mess-Konfigurationen	26
8.2	Der Patch-Clamp-Messstand	28
8.2.1	Das Mikroskop	28
8.2.2	Messkammer und Perfusionssystem	28
8.2.3	Messtisch und mechanische Komponenten	29
8.2.4	Elektronische Komponenten	29
8.3	Die Elektroden	30
8.4	Die Patchpipetten	31
8.5	Vorzeichenkonvention	31
8.6	Datenerfassung	32
8.7	Durchführung der Patch-Clamp-Experimente	32
8.7.1	Messung des Membranpotentials	35
8.7.2	Messung der Ionenströme	35
8.7.3	Pulsprotokoll zur Messung der Ionenströme	36

9 Immunfluoreszenz-Analyse	37
9.1 Grundlagen der Immunfluoreszenz	37
9.2 Verwendete Antikörper	39
9.3 Durchgeführte Doppelmarkierungen	41
9.4 Immunhistochemische Markierung des intakten Plexus submucosus	42
9.5 Immuncytochemische Markierung der primären submucösen Zellkultur	44
9.6 Mikroskopie	45
9.7 Negativkontrollen	45
10 Ussingkammer-Messungen	46
10.1 Theorie der Ussingkammer-Technik	46
10.2 Messkammer	47
10.3 Versuchsdurchführung und Datenerfassung	48
11 Statistik	49
 III Ergebnisse	 50
1 Basale Charakterisierung der Neurone des intakten Plexus submucosus	
aus dem Colon der Ratte	50
1.1 Immunhistochemische Identifizierung der submucösen Zelltypen	50
1.2 Untersuchung der Wirkung von Carbachol auf Neurone des intakten	
Plexus submucosus	52
1.3 Untersuchung der Bradykinin-Wirkung auf Neurone des	
intakten Plexus submucosus	53
1.4 Identifizierung der beteiligten Bradykinin-Rezeptoren	55
1.4.1 Identifizierung der Bradykinin-Rezeptoren durch	
Agonisten- und Antagonisten-Versuche	55
1.4.2 Identifizierung der Bradykinin-Rezeptoren durch	
immunhistochemische Markierungen	60
2 Beteiligung von Cyclooxygenase-Metaboliten am Bradykinin-Effekt	62
2.1 Einfluss von Prostaglandinen auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration	
von submucösen Neuronen	63
2.2 Einfluss von Prostaglandinen auf die neuronal-vermittelte	
mucosale Cl^- -Ionen-Sekretion	65

3	Identifizierung des Bradykinin-Signaltransduktionswegs	67
3.1	Identifizierung des an den Bradykinin-Rezeptor gekoppelten G-Proteins	67
3.2	Untersuchung des klassischen G_q -Protein-vermittelten Signalwegs	68
3.2.1	Hemmung der Phospholipase C.....	68
3.2.2	Hemmung des IP_3 - und des Ryanodin-Rezeptors	69
3.3	Untersuchung alternativer Signalwege	72
3.3.1	Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+}	72
3.3.2	Beteiligung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Ca_v -Kanälen) ..	73
3.3.3	Subtyp-Identifizierung der beteiligten Ca_v -Kanäle	75
4	Etablierung der primären submucösen Zellkultur	81
4.1	Basale immunhistochemische Charakterisierung der isolierten kultivierten submucösen Neurone	81
4.2	Immuncytochemischer Nachweis der Bradykinin-Rezeptoren	82
5	Effekt von Bradykinin auf isolierte submucöse Neurone	85
5.1	Effekt von Bradykinin auf das Membranpotential isolierter submucöser Neurone	85
5.2	Effekt von Bradykinin auf die Ionenströme isolierter submucöser Neurone	88
IV	Diskussion	90
1	Basale Charakterisierung des Plexus submucosus aus dem Colon der Ratte	90
1.1	Klassifizierung enterischer Neurone	91
1.2	Transmitter des enterischen Nervensystems	93
1.3	Gliazellen	94
2	Bradykinin	96
2.1	Entdeckung von Bradykinin	96
2.2	Wirkung von Bradykinin	96
2.3	Bradykinin-Rezeptoren	97
3	Einfluss von Bradykinin auf die Cl^- -Sekretion am Darmepithel	99
3.1	Einfluss von Cyclooxygenase-Metaboliten auf den Bradykinin-Effekt	100
4	Ca^{2+} als intrazellulärer Botenstoff	102

5	Intrazelluläre Vermittlung der Wirkung von Bradykinin auf submucöse Neurone	103
5.1	Fehlende Beteiligung des PLC-IP ₃ -Ca ²⁺ -Signalwegs.....	103
5.2	Beteiligung von Ca _v -Kanälen	106
5.3	Wirkung von Bradykinin auf das Membranpotential und die Ionenströme submucöser Neurone	109
6	Fazit	110
 V Zusammenfassung		113
VI Summary		114
VII Literaturverzeichnis		115
VIII Anhang		128
1	Versicherung	128
2	Danksagung	129

I Einleitung

1 Der Plexus submucosus als Teil des enterischen Nervensystems

Das enterische Nervensystem (ENS) ist ein komplexes Geflecht aus Millionen von Nervenzellen innerhalb des Gastrointestinaltrakts. Zu seinen Hauptaufgaben gehört die Steuerung von Verdauungsvorgängen. Im Darm reguliert es die Sekretion und Resorption von Elektrolyten, die Motilität und den Blutfluss. Unterteilen lässt es sich in zwei innerhalb der Magen-Darmwand lokalisierte Plexus, die unabhängig von Gehirn oder Rückenmark arbeiten (Bayliss 1899).

Bei den zwei Plexus handelt es sich um den in dieser Arbeit untersuchten Plexus submucosus sowie den Plexus myentericus. Beide Nervengeflechte wurden schon sehr früh morphologisch beschrieben. Der submucöse Plexus (auch Meissner-Plexus genannt) befindet sich innerhalb der submucösen Schicht, die zwischen der Zirkulärmuskulatur und der Schleimhaut lokalisiert ist (Abb. I-1) (Meissner 1857). Dieser Plexus steht mit den mucosalen Epithelzellen in Verbindung und kann so die Resorption und Sekretion von Elektrolyten und Wasser regulieren (Bornstein & Furness 1988). Damit spielt der Plexus submucosus eine wichtige Rolle beim Erhalt der Wasserhomöostase (Andres et al. 1985, Surprenant 1994). Der Plexus myentericus, auch Auerbach-Plexus genannt, liegt zwischen der longitudinalen und der zirkulären Muskulatur (Auerbach 1862). Seine Funktion besteht dementsprechend hauptsächlich in der Steuerung der Darmmotilität.

Die einzelnen Neurone des ENS sind meistens in Ganglien angeordnet. Je nach Spezies und Plexus bestehen sie aus Ansammlungen von einigen wenigen bis über zwanzig Neuronenzellkörpern. Untereinander sind die Ganglien durch interganglionäre Faserstränge verbunden, die aus den Neuronen-Fortsätzen bestehen (Song et al. 1998). Sie bilden so ein flächenhaftes Netzwerk (Furness & Costa 1980), das sich im myenterischen Plexus durch eine regelmäßige Netzstruktur auszeichnet, während die Nervenfasern im Plexus submucosus unregelmäßig angeordnet sind. Um eine koordinierte, den Erfordernissen des gesamten Organismus gerecht werdende Funktion des Gastrointestinaltrakts sicherzustellen, stehen nicht nur die Neurone innerhalb eines Plexus miteinander in Kontakt, sondern auch die beiden Plexus untereinander. Zusätzlich findet eine Interaktion beider enterischer Nervengeflechte

mit dem klassischen vegetativen Nervensystem, d.h. Sympathikus und Parasympathikus, statt (Cooke 1989, Phillips & Powley 2007).

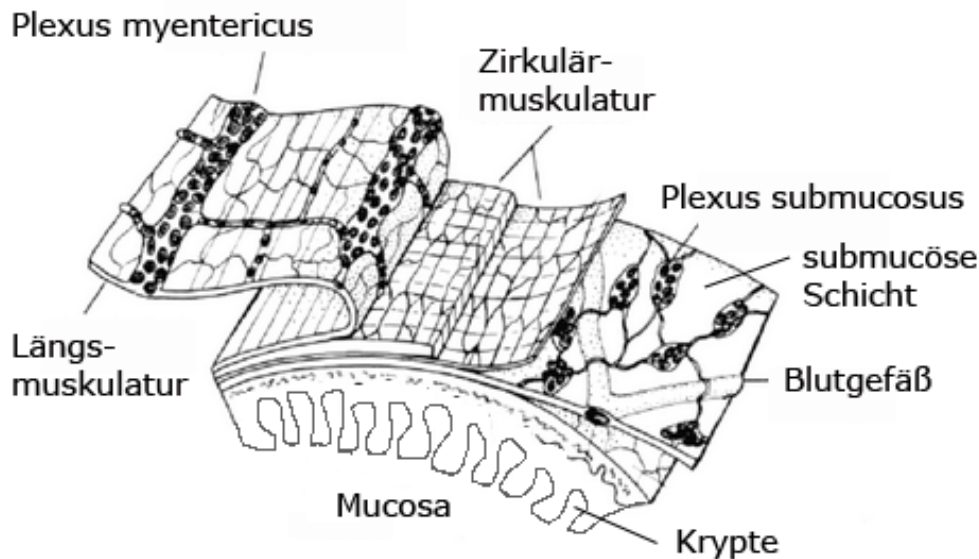


Abb. I-1: Schematischer Querschnitt durch die Colonwand

Die Mucosa ist dem Darminneren zugewandt. Die als Krypten bezeichneten Einsenkungen der Darmschleimhaut dienen der Oberflächenvergrößerung. Zwischen der Mucosa und der Zirkulärmuskulatur befindet sich die submucöse Schicht, innerhalb derer der Plexus submucosus verläuft. Der Plexus myentericus liegt zwischen der Zirkulär- und der Längsmuskulatur (Modifiziert nach Furness & Costa 1980).

2 Der Entzündungsmediator Bradykinin

Bradykinin ist eine aus neun Aminosäuren bestehende parakrine Substanz aus der Familie der Kinine, die nach Verletzungen oder während Entzündungen sowohl im Plasma als auch im Gewebe gebildet wird (Abb. I-2). Die Wirkungen im Körper sind sehr vielfältig. So ist Bradykinin unter anderem an der Schmerzentstehung und -empfindung beteiligt, wirkt erweiternd und permeabilitätsfördernd auf Blutgefäße und kontraktionsauslösend auf die übrige glatte Muskulatur. Auch im Darm führt Bradykinin zur Schmerzentstehung und Kontraktion der glatten Muskulatur (Khairallah & Page 1963, Maubach & Grundy 1999). Bradykinin kann dort sowohl die Epithelzellen der Schleimhaut als auch die Neurone, die diese Zellen innervieren, stimulieren. Die Folge der Bradykinin-Stimulation ist in beiden

Fällen eine gesteigerte Sekretion von Cl^- und H_2O in das Darmlumen (Cuthbert & Margolius 1982, Diener et al. 1988a, Gaginella & Kachur 1989, Baird et al. 2008), was zu einer sekretorischen Diarrhoe führen kann.

Eine weitere wichtige Funktion von Bradykinin ist das Auslösen von Entzündungsreaktionen. Im gesunden Gastrointestinaltrakt werden über die Mucosa H_2O , Na^+ , Cl^- , HCO_3^- und Mukus kontrolliert in angepassten Mengen in das Darmlumen sezerniert. Durch entzündliche Vorgänge innerhalb des Darms, wie sie bei inflammatorischen Darmerkrankungen wie der Colitis ulcerosa oder des Morbus Crohn vorkommen, wird dieses empfindliche Gleichgewicht gestört. Die basale Sekretion verändert sich und es kommt zu charakteristischen Symptomen wie einer verstärkten Cl^- -Sekretion. Es wird angenommen, dass Entzündungsmediatoren wie Bradykinin bei diesen Prozessen beteiligt sind (Devani et al. 2005, Stadnicki et al. 2005).

Es sind zwei Subtypen von Bradykinin-Rezeptoren bekannt: der Bradykinin B1- und B2-Rezeptor. Sie gehören beide zu heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Rhodopsinfamilie, unterscheiden sich jedoch in ihrer Funktion, ihrem Expressionsmuster und ihrem Agonisten- bzw. Antagonisten-Profil. Die Expression des Bradykinin B1-Rezeptors findet kaum oder gar nicht in gesundem Gewebe statt und wird erst während entzündlichen Prozessen induziert (für eine Übersicht siehe Prado et al. 2002, Leeb-Lundberg et al. 2005). Der Bradykinin B2-Rezeptor wird ubiquitär exprimiert und vermittelt die Effekte von Bradykinin in gesundem Gewebe.

Physiologische Agonisten des Bradykinin B2-Rezeptors sind Bradykinin und Kallidin (= Lys-Bradykinin). Beide werden durch das Enzym Kallikrein aus Kininogenen gebildet (Abb. I-2). Im Plasma entsteht Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen, während im Gewebe Lys-Bradykinin aus niedrig molekularem Kininogen gebildet wird, das in einem zweiten Schritt durch eine Aminopeptidase in Bradykinin umgewandelt wird (Abb. I-2). Der enzymatische Abbau von Bradykinin erfolgt nach einer sehr kurzen Halbwertszeit durch Abspalten des C-terminalen Arginins. Dabei entstehen die Agonisten des Bradykinin B1-Rezeptors: des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg¹⁰-Kallidin (Abb. I-2) (Farmer 1992, Hess et al. 1994).

Es wird vermutet, dass ein Teil der Bradykinin-Effekte erst sekundär durch die Wirkung von Prostaglandinen induziert wird. Prostaglandine sind Signalstoffe, die an der Entstehung von Schmerzen und Entzündungsprozessen beteiligt sind. Sie gehören wie Bradykinin zur Gruppe der parakrinen Substanzen. Die Synthese von Prostaglandinen durch Cyclooxygenasen erfolgt als Reaktion auf Entzündungen, kann aber auch durch Bradykinin

alleine ausgelöst werden. An Gliazellen beispielsweise kann Bradykinin in manchen Teilen des ENS die Synthese und Ausschüttung von Prostaglandinen hervorrufen, die wiederum benachbarte Neurone aktivieren (Murakami et al. 2007).

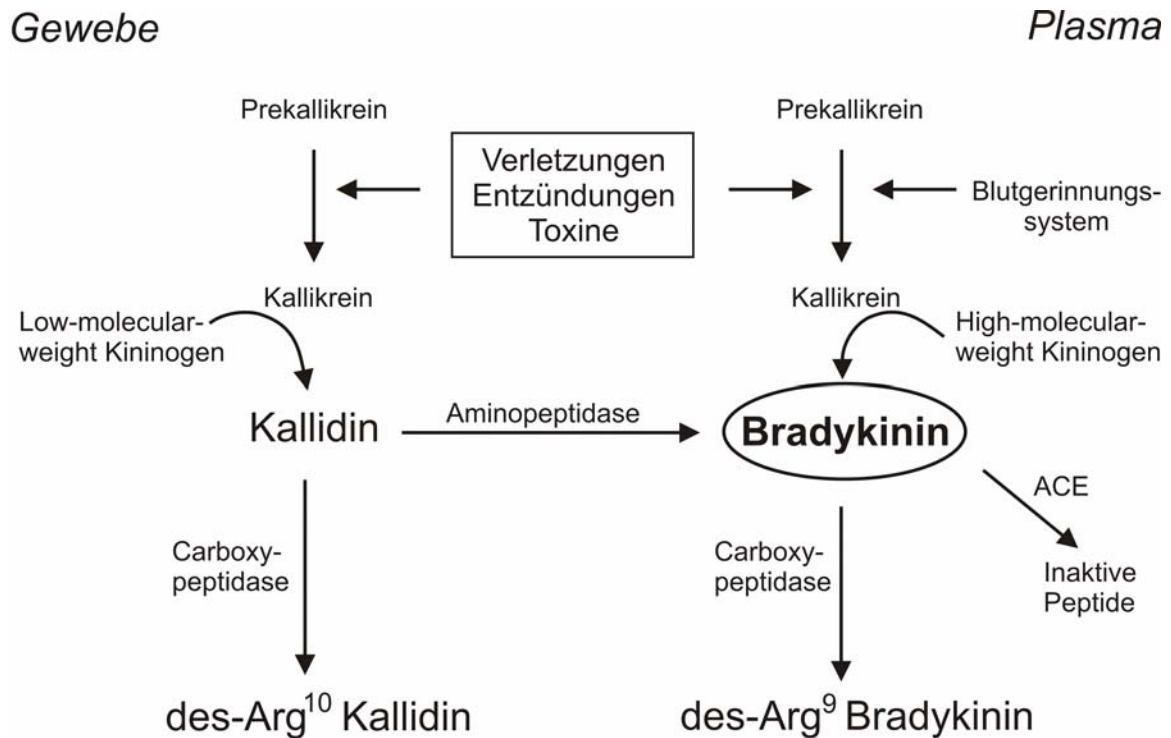


Abb. I-2: Bildung und Abbau von Bradykinin

Enzyme stehen neben den Pfeilen, ACE = angiotensin converting enzyme

3 Intrazelluläre neuronale Prozesse

Neurotransmitter, aber auch viele andere Signalstoffe wie z.B. Bradykinin, können in Nervenzellen durch Bindung an einen Rezeptor intrazelluläre Prozesse auslösen, die zu einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration oder zu einer Depolarisation der Zellmembran führen. Beides zeigt eine gesteigerte neuronale Aktivität an. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration kann auf zwei Wegen erfolgen: durch Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Reticulum (ER) und durch Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum. Löst ein Signalstoff eine Depolarisation des Neurons aus, wird das Ruhemembranpotential zu einem weniger negativen Membranpotential

verschoben. Üblicherweise geschieht dies durch einen Einstrom von Kationen, aber zum Teil auch durch einen verminderten Kalium-Ausstrom.

Bradykinin-Rezeptoren sind üblicherweise an ein G_q -Protein gekoppelt, das den sogenannten PLC- IP_3 - Ca^{2+} -Signalweg aktiviert, der zu einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führt (Farmer 1997, Leeb-Lundberg et al. 2005). Der erste Schritt dieser Signalkaskade wird von dem Enzym Phospholipase C (PLC) vermittelt, das Phospholipide in die Produkte IP_3 und Diacylglycerin spaltet. IP_3 kann dann durch Bindung an den in der Membran des ER lokalisierten IP_3 -Rezeptor eine Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem ER in das Cytosol induzieren.

Neben diesem Mechanismus der Ca^{2+} -Erhöhung ist auch der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Ca_v -Kanäle) weit verbreitet. Diese Kanäle kommen in nahezu allen erregbaren Zellen von Vertebraten, Invertebraten und sogar Pflanzen vor (Dolphin 1995). Im Ruhezustand der Zelle sind Ca_v -Kanäle inaktiv und geschlossen, können aber durch Depolarisation der Zelle aktiviert und damit geöffnet werden. Diese Kanäle besitzen also die Fähigkeit, den Erregungszustand eines Neurons in Ca^{2+} -abhängige intrazelluläre Prozesse zu übersetzen.

Je nach Funktion variiert der molekulare Aufbau der Ca_v -Kanäle (Übersicht bei Dolphin 1995), wonach sie in drei Unterfamilien eingeteilt werden (Tabelle I-1; Übersicht bei Bean et al. 1989, Catterall et al. 2003). L-Typ-Kanäle stellen die erste Unterfamilie dar (Ca_v 1.1 - 1.4). Die zweite Unterfamilie setzt sich zusammen aus Kanälen des P- und Q-Typs (Ca_v 2.1), des N- (Ca_v 2.2) und des R-Typs (Ca_v 2.3) (Catterall et al. 2005). Die T-Typ-Kanäle bilden die dritte Unterfamilie (Ca_v 3.1 - 3.3).

Tabelle I-1: Übersicht über die verschiedenen Subtypen der Ca_v -Kanäle und ihren Antagonisten.

Alte Klassifizierung	Neue Nomenklatur	Spannung	Antagonisten
L-Typ	Ca_v 1.1 - 1.4	HVA	Verapamil
P-Typ	Ca_v 2.1	HVA	ω -Agatoxin IVA
Q-Typ	Ca_v 2.1	HVA	ω -Conotoxin MVIIC
N-Typ	Ca_v 2.2	HVA	ω -Conotoxin GVIA
R-Typ	Ca_v 2.3	HVA	SNX-482
T-Typ	Ca_v 3.1 - 3.3	LVA	Flunarizin

HVA = high voltage activated, LVA = low voltage activated

4 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Bis zur Durchführung dieser Arbeit war wenig über submucöse Neurone aus dem Colon der Ratte bekannt. Ein Ziel war es deshalb, diese Neurone basal zu charakterisieren. Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Untersuchung des Wirkmechanismus des Entzündungsmediators Bradykinin. Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden (Abb. I-3 gibt eine Übersicht):

- Welchen Effekt löst Bradykinin an submucösen Neuronen aus dem Colon der Ratte aus?
- Sind submucöse Gliazellen an der Bradykinin-Wirkung beteiligt?
- Welchen Einfluss hat Bradykinin auf die mucosale Cl^- -Sekretion?
- Ist der Bradykinin-Effekt abhängig von oder vermittelt durch Prostaglandine?
- Welche Bradykinin-Rezeptoren vermitteln an submucösen Neuronen der Ratte die Wirkung von Bradykinin und an welches G-Protein ist der beteiligte Rezeptor gekoppelt?
- Von welcher Bedeutung bei der Antwort auf Bradykinin ist der klassische $\text{PLC-IP}_3\text{-Ca}^{2+}$ -Signalweg, der zu einer Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem ER führt? Sind IP_3 - oder Ryandodin-Rezeptoren beteiligt?
- Spielt bei der Bradykinin-Antwort der Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum über Ca_v -Kanäle eine Rolle? Wenn ja, welche Subtypen sind daran beteiligt?
- Welchen Effekt übt Bradykinin auf das Membranpotential submucöser Neurone aus?
- Welche Wirkung hat Bradykinin auf die Ionenströme dieser Neurone?

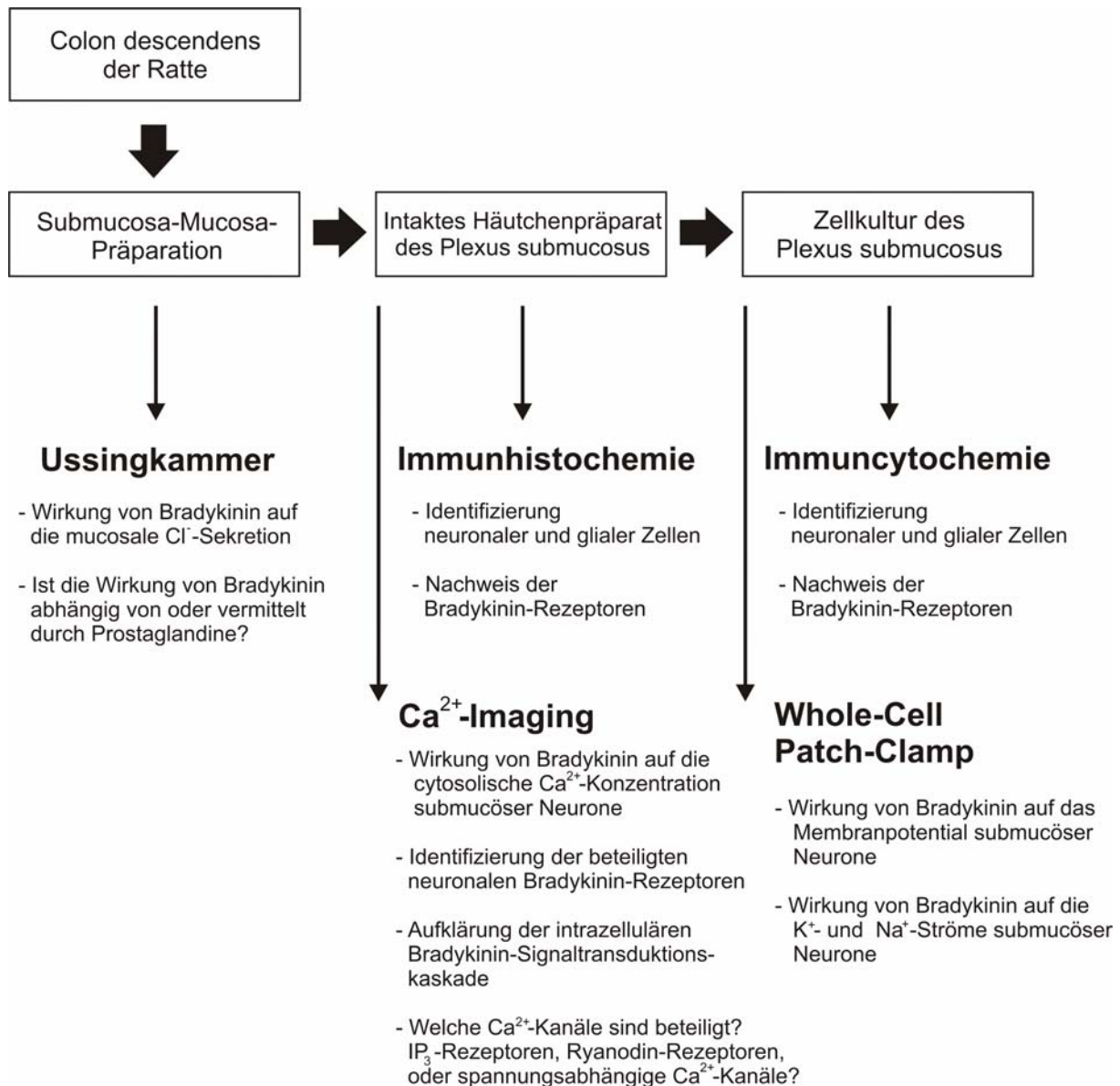


Abb. I-3: Übersicht über die Fragestellungen und die methodische Durchführung

In mehreren Präparationsschritten (breite Pfeile) konnten aus dem Colon der Ratte verschiedene Gewebe bzw. Zellen gewonnen werden (schwarzer Rahmen). Die schmalen Pfeile zeigen die durchgeführten Experimente und die damit bearbeiteten Fragestellungen.

II Material und Methoden

1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Wistar-Ratten aus eigener Zucht des Instituts für Veterinär-Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Futter und Wasser standen während der gesamten Zeit ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden in einem ganzjährig klimatisierten Raum mit einem 12-Stunden-helldunkel-Rhythmus gehalten. Die Ussingkammer-Versuche wurden mit weiblichen Ratten mit einem Körpergewicht von 150 bis 380 g durchgeführt. Für sämtliche anderen Versuche wurden weibliche Ratten im Alter von fünf bis sechs Wochen und einem Gewicht von 110 bis 150 g verwendet.

2 Lösungen

2.1 Lösungen für immunhisto- und immuncytochemische Markierungen

2.1.1 Phosphatpuffer (PBS)

Der Phosphatpuffer setzte sich aus NaH_2PO_4 -Stammlösung ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und Na_2HPO_4 -Stammlösung ($0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zusammen. Ein Volumenteil der NaH_2PO_4 -Stammlösung wurde mit vier Volumenteilen der Na_2HPO_4 -Stammlösung gemischt. Um eine Endkonzentration von $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ zu erhalten, wurde die Lösung 1:1 mit Aqua dest. gemischt. Der pH-Wert wurde mit NaOH/HCl auf 7,4 eingestellt.

2.1.2 Fixierungslösung

In 100 ml Phosphatpuffer wurden 4 g Paraformaldehyd (PFA) unter ständigem Rühren und Erwärmen auf bis zu 60°C gelöst. Nach Aufklaren der Lösung wurden eventuelle letzte Rückstände durch Filtrieren entfernt. Alle Schritte wurden im Abzug durchgeführt. Lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt, ließ sich die Fixierungslösung bis zu zwei Wochen verwenden.

2.1.3 Blockierungslösungen

Die Blockierungslösung für das intakte submucöse Häutchenpräparat (Submucosa-Präparat) bestand aus PBS, dem 10 % (Vol/Vol) fetales Kälberserum (FKS) und 0,5 % (Vol/Vol) Triton-X-100 zugesetzt waren. Für die submucöse Zellkultur wurden ebenfalls 10 % (Vol/Vol) FKS, jedoch nur 0,05 % (Vol/Vol) Triton-X-100 in PBS gelöst.

2.1.4 Primärantikörperlösungen

Der jeweilige primäre Antikörper wurde der Blockierungslösung für das Submucosa-Präparat oder der Blockierungslösung für die Zellkultur in der benötigten Verdünnung (siehe Tabelle II-1) zugesetzt.

2.1.5 Sekundärantikörperlösungen

Der jeweilige sekundäre Antikörper wurde der Blockierungslösung für das Submucosa-Präparat oder der Blockierungslösung für die Zellkultur in der benötigten Verdünnung (siehe Tabelle II-2) zugesetzt.

2.1.6 DAPI-Lösung

Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat) verwendet. Die Stammlösung ($10,9 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) wurde aus 10 mg DAPI und 2 ml Aqua dest. hergestellt. Durch Mischen von $6,8 \mu\text{l}$ DAPI-Stammlösung mit 250 ml PBS erhielt man die Gebrauchslösung ($300 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

2.2 Lösungen für die Ca^{2+} -Imaging-Messungen

2.2.1 Standard-Tyrodelösung

Die während den Ca^{2+} -Imaging-Messungen perfundierte Lösung war eine Tyrodelösung folgender Zusammensetzung (in $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$): 135 NaCl; 5,4 KCl; 1 CaCl_2 ; 1 MgCl_2 ; 12,2 Glucose und 10 HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure). Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

2.2.2 Fura-2 AM-Lösung

1 mg Fura-2 AM wurde in 1 ml DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20° C eingefroren. Die gebrauchsfertige Lösung zum Aufladen der Zellen wurde täglich frisch hergestellt und basierte auf der Standard-Tyrodelösung, der 0,05 % (Vol/Vol) Pluronic und Fura-2 AM (11,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zugesetzt waren.

2.2.3 Ca^{2+} -freie Tyrodelösung

Die Ca^{2+} -freie Perfusionslösung war eine modifizierte Standard-Tyrodelösung, bei der ohne Zugabe eines Chelators CaCl_2 weggelassen wurde.

2.3 Lösungen für die Patch-Clamp-Messungen

2.3.1 Standard-Tyrodelösung

Während der Patch-Clamp-Messungen wurde eine Tyrodelösung mit folgender Zusammensetzung (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) perfundiert: 135 NaCl; 5,4 KCl; 1 CaCl_2 ; 1 MgCl_2 ; 12,2 Glucose und 10 HEPES. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

2.3.2 Standard-Pipettenlösung

Die Lösung mit der die Patchpipette für die Whole-Cell-Messungen befüllt wurde, enthielt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): 100 K^+ -Gluconat; 30 KCl; 10 NaCl; 0,1 EGTA (Ethylenglycol bis-(β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure); 10 Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan); 5 ATP (Adenosin 5'-triphosphat Dinatriumsalz); 0,2 GTP (Guanosin-5'-triphosphat Trinatriumsalz) und 2,0 MgCl_2 . Der pH-Wert wurde mit Tris/HCl auf 7,2 eingestellt.

2.4 Lösung für die Ussingkammer-Messungen

2.4.1 Bicarbonat-gepufferte Parsons-Lösung

Die Lösung (Parsons & Paterson 1965) enthielt (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$): 107 NaCl; 4,5 KCl; 25 NaHCO_3 ; 1,8 Na_2HPO_4 ; 0,2 NaH_2PO_4 ; 1,25 CaCl_2 ; 1 MgSO_4 und 12,2 Glucose. Bei 37°C wurde die Lösung mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid; Vol/Vol) begast und der pH-Wert mit $\text{NaHCO}_3/\text{HCl}$ auf 7,4 eingestellt.

2.5 Lösung für die Isolation des Plexus submucosus

Während der Isolation des Colons und der Präparation des submucösen Häutchenpräparats wurde eine Tyrodelösung mit folgender Zusammensetzung (in $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) verwendet: 135 NaCl; 5,4 KCl; 1 CaCl_2 ; 1 MgCl_2 ; 12,2 Glucose und 10 HEPES. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

2.6 Lösungen für die primäre submucöse Zellkultur

2.6.1 Isolationslösung

Zur Isolation des Colons und der anschließenden Präparation des submucösen Häutchenpräparats wurde eine Hanks balanced salt solution (HBSS) verwendet, der $12,2\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose zugesetzt war.

2.6.2 Enzymatische Digestionslösung

Das Häutchenpräparat wurde enzymatisch in folgender Digestionslösung verdaut: HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ; HEPES ($10\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$); $1,8\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Collagenase Typ II und $1,6\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Trypsin (bovin).

2.6.3 Zellkulturmedium

Die submucösen Zellen wurden in einem 37°C warmen, ständig mit Carbogen begasten Medium mehrere Tage kultiviert. Das Zellkulturmedium setzte sich folgendermaßen zusammen: NeurobasalTM-A-Medium, Penicillin ($10\,000\text{ units}\cdot\text{ml}^{-1}$)/Streptomycin ($10\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 10 % (Vol/Vol) FKS und $0,5\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glutamin.

2.7 Lösungen zur Beschichtung der Glasplättchen

2.7.1 Poly-L-Lysin-Lösungen

Die Glasplättchen auf denen die submucösen Häutchenpräparate aufgeklebt wurden, sind auf einer Heizplatte mit einer Lösung aus gleichen Volumenanteilen Poly-L-Lysin (0,1 mg·ml⁻¹, M.W. > 300.000) und Aqua dest. möglichst dünn beschichtet worden. Zur Anheftung der isolierten submucösen Zellen für die Zellkultur wurden Glasplättchen verwendet, die unter sterilen Bedingungen mit möglichst wenig purem Poly-L-Lysin beschichtet wurden.

3 Substanzen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Substanzen von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Folgende Substanzen stammten von anderen Herstellern:

- ω -Agatoxin IVA (Alomone labs, ICS, München, Deutschland)
- bovines Serum Albumin (BSA Fraktion V, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Citifluor (Plano, Wetzlar, Deutschland)
- Cyclopiazonsäure (Alexis, Lörrach, Deutschland)
- ω -Conotoxin MVIIC (Alomone labs, ICS, München, Deutschland)
- ω -Conotoxin GVIA (Alomone labs, ICS, München, Deutschland)
- 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dilactat (DAPI) (Invitrogen, Leiden, Niederlande)
- Fura-2 Acetoxymethylester (AM) (Invitrogen, Leiden, Niederlande)
- Indomethacin (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
- Poly-L-Lysin (Molekulargewicht: > 300 kD), Gebrauchslösung: 0,1 mg·ml⁻¹ (Biochrom KG, Berlin, Deutschland)
- 9,21-Dehydro-Ryanodin (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
- SNX-482 (Alomone labs, ICS, München, Deutschland)

- U-73122 (1-[6(17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrol-2,5-dion) (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland)
- Xestospongin C (Biozol, Eching, Deutschland)
- YM-254890 (freundlicherweise überlassen von Dr. Taniguchi, Yamanouchi Pharmaceutical, Ibaraki, Japan)

4 Beschichtung der Glasplättchen

Das intakte Häutchenpräparat der Submucosa sowie die kultivierten submucösen Zellen sollten mikroskopisch untersucht werden. Daher war es sehr wichtig, das intakte Gewebe oder die isolierten Zellen auf einer Oberfläche aufzubringen bzw. wachsen zulassen, die auch für optische Messungen wie das Ca^{2+} -Imaging oder die Detektierung von Immunfluoreszenzsignalen gut geeignet ist. Aufgrund der optischen Eigenschaften eignet sich Glas dazu optimal (Freshney 1990). Die Oberflächenbeschaffenheit und elektrische Ladung von Glas begünstigt zudem das Anheften der Zellen. Es wurden runde Glasplättchen mit 13 mm Durchmesser und einer Stärke von 0,16 - 0,19 mm verwendet (W. Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland). Als am besten geeigneter Untergrund stellte sich mit Poly-L-Lysin beschichtetes Glas heraus. Poly-L-Lysin besitzt negative Ladungen und damit elektrostatische Kräfte, die das Anheften der Gewebe und Zellen verbessern.

Um das submucöse Häutchenpräparat auf den Glasplättchen ankleben zu können, wurden diese folgendermaßen beschichtet: Die Poly-L-Lysin-Lösung (siehe II-2.7.1) wurde auf die zuvor in Aqua dest. gereinigten Glasplättchen getropft, bis die ganze Oberfläche bedeckt war. Auf einer Heizplatte wurde die Poly-L-Lysin-Lösung unter leichter Blasenbildung verdampft, bis nur noch eine transparente trockene Schicht zurückblieb. Die so hergestellten beschichteten Glasplättchen konnten zwei Tage unter Lichtschutz aufbewahrt werden.

Zur Anheftung von isolierten Zellen, die kultiviert werden sollten, wurden die Glasplättchen unter sterilen Bedingungen unter einer Flowbench vorbereitet. Die in Ethanol aufbewahrten Glasplättchen wurden zunächst abgeflammt, um das verbliebene Ethanol zu entfernen, und nach dem Abkühlen in Zellkulturschalen gelegt. Dort wurden sie mit wenigen Tropfen unverdünntem Poly-L-Lysin (siehe II-2.7.1) benetzt, sodass die gesamte Glasoberfläche bedeckt war. Nach ca. zwei Stunden unter Lichtschutz war das Poly-L-Lysin getrocknet und die Plättchen bereit für das Aussäen der Zellen.

5 Gewebepräparation

5.1 Herstellung der Submucosa-Mucosa-Präparate

Die Ratten wurden zunächst mit einem Isofluran-Luftgemisch betäubt und anschließend durch eine zervikale Dislokation und einen Herzschnitt getötet (genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen). Die Eröffnung der Bauchhöhle erfolgte über einen Schnitt an der Linea alba. Zwei Entlastungsschnitte – jeweils entlang der Rippenbögen – erleichterten den Zugang. Durch vorsichtiges Verlagern des Darms erhielt man freie Sicht auf das Colon. Das durch einen Lymphknoten markierte, distale Ende des Colons (Lindström et al. 1979) wurde mit einer Schere durchtrennt und das Mesenterium entlang des Darms stumpf abpräpariert. Das proximale Ende des Colons wurde am Übergang zum Caecum abgesetzt. Durch Lagerung des heraus getrennten Darmstückes in eiskalter Tyrodelösung entspannte sich die Muskulatur und das Darmlumen konnte durchgespült und damit von Rückständen befreit und gereinigt werden. Im Anschluss wurde der Darm auf einen Kunststoffstab mit einem Durchmesser von 5 mm aufgezoogen und mit Hilfe eines stumpfen Skalpells am distalen Ende eine zirkuläre Inzision gesetzt. Vorsichtig konnte nun die Serosa und die Muscularis propria von distal nach proximal abgelöst werden. Das so entstandene Submucosa-Mucosa-Präparat wurde der Länge nach aufgetrennt und von dem Plastikstab heruntergelöst. Ca. 3 cm lange Stücke dieses Präparats fanden in Ussingkammer-Versuchen Verwendung.

5.2 Herstellung der Submucosa-Präparate (intakte Häutchenpräparate des Plexus submucosus)

Für die Ca^{2+} -Imaging-Versuche und die immunhistochemischen Markierungen wurde zusätzlich zu den in II-5.1 beschriebenen Präparationsschritten die Mucosa entfernt. Dazu wurde das Submucosa-Mucosa-Präparat (siehe II-5.1) mit der mucosalen Seite nach oben flach auf einer von Tyrodelösung umspülten festen Unterlage ausgebreitet und fixiert. Mit der scharfen Kante eines Glasobjektträgers wurde die Mucosa eingeschnitten. An dieser Inzision ansetzend konnte die Mucosa von der darunter liegenden Submucosa abgezogen werden.

Um beide Schichten korrekt voneinander zu trennen, musste bei diesem Schritt auf die Einhaltung einer bestimmten Schnitttiefe geachtet werden. Bei einem zu tiefen Schnitt konnte leicht das gesamte Gewebe durchtrennt werden, ein zu flacher Einschnitt dagegen führte dazu, dass sich die Mucosa nicht als Ganzes ablösen ließ. Um eine Beschädigung oder das Einreißen der Submucosa während der Präparation zu verhindern, bewährte es sich, das Gewebe leicht zu spannen, es dabei aber möglichst geringen Druck- und Zugbelastungen auszusetzen. Die so erhaltene submucöse Schicht, innerhalb derer sich der Plexus submucosus befindet, wurde in ca. 0,5 cm² große Stücke zerteilt und bis zum Aufbringen auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen in kalter Tyrodelösung gelagert. Mit Hilfe von zwei Pinzetten konnten die Stücke der Submucosa dann auf den zuvor beschichteten Glasplättchen angedrückt und gespannt werden. Um eine Austrocknung zu verhindern, war das Gewebe bei allen Schritten stets mit Flüssigkeit bedeckt.

6 Primäre Zellkultur des Plexus submucosus

6.1 Enzymatischer Verdau der Submucosa

Um Zellen für die primäre Zellkultur zu gewinnen, wurde die Submucosa enzymatisch verdaut. Die Präparation der Submucosa erfolgte wie in II-5.1 und II-5.2 beschrieben, allerdings wurde statt der Tyrodelösung eine Isolationslösung verwendet, die aus HBSS mit $12,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose bestand. Alle auf die Isolation der submucösen Schicht folgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt.

Das Submucosa-Präparat wurde zunächst in kleine Stücke zerteilt und in kalte HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verbracht. Um den pH-Wert dieser Lösung stabil zu halten, waren $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ HEPES zugesetzt. Der Verdau der Submucosa wurde durch Zugabe von $1,8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Collagenase II und $1,6 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bovines Trypsin gestartet. Die benötigte Enzymmenge konnte mit der jeweiligen Lot-Nummer schwanken und musste in diesen Fällen angepasst werden. Der Verdau erfolgte unter Carbogen-Begasung bei 37°C in einem Heizblock. Um eine Durchmischung der Enzymlösung zu gewährleisten, fand die Inkubation unter ständiger Bewegung statt. Die dadurch wirkenden mechanischen Kräfte sorgten zudem für ein besseres Ergebnis des Verdaus.

Als Verdauungsgefäß wurden Drosophila-Aufzuchttröhrchen verwendet. Diese zeichneten sich durch einen flachen Boden, der im Vergleich zu herkömmlichen Zellkulturröhrchen einen großen Durchmesser besaß, aus. Aufgrund dieser Form hatten die Gewebestücke ausreichend Platz zur Bewegung und wurden gleichzeitig von einem großen Volumen der enzymhaltigen Lösung umspült. Die Dauer des Verdaus richtete sich nach dem Grad der Homogenisierung des submucösen Gewebes und betrug 1 h und länger. Innerhalb dieser Zeit wurde die angedaute Submucosa zusätzlich vorsichtig manuell vereinzelt. Dazu wurden die Gewebestücke erst durch großlumige Kanülen und später durch immer engere Kanülen aufgezogen und abgelassen. Um die Zellen nicht zu beschädigen, erfolgten diese Schritte sehr langsam und vorsichtig.

Erst wenn die Verdauungslösung eine homogene trübe Erscheinung hatte und keinerlei Strukturen mehr erkennbar waren, wurde der Verdau beendet. Dies geschah durch Hinzufügen von 4°C kalter HEPES-gepufferter HBSS. Nach dem Durchmischen erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 900 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das

Zellpellet in ebenfalls 4° C kaltem Zellkulturmedium vorsichtig gelöst und vereinzelt bis eine homogene Lösung entstand. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Zellpellet in 800 µl des auf ca. 25° C vorgewärmten Zellkulturmediums gelöst und vereinzelt. Diese homogene Zellsuspension wurde dann ausgesät, indem jeweils 100 µl auf eine der acht vorbereiteten, mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen aufgebracht wurden. In den folgenden zwei Stunden im Brutschrank hatten die Zellen Gelegenheit, sich auf dem Boden der Glasplättchen anzuheften. Anschließend wurden die Zellkulturschälchen mit 37° C warmem Zellkulturmedium aufgefüllt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte für 2 - 5 Tage im Brutschrank bei 37° C unter ständiger Carbogen-Begasung. Alle zwei Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

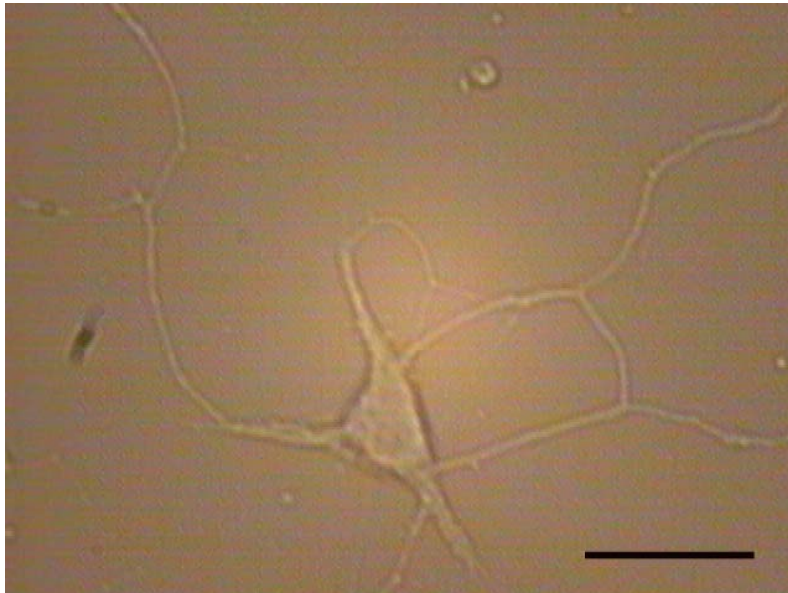


Abb. II-1: Durchlichtdarstellung eines isolierten kultivierten submucösen Neurons

Die Abbildung zeigt ein einzelnes kultiviertes Neuron, das direkt auf dem Boden eines Glasplättchens wächst. Die Zellmembran ist deutlich zu erkennen. Auffällig ist die starke Verzweigung. Kein Fortsatz kann eindeutig als Axon ausgemacht werden. Eichbalken = 100 µm

7 Ca^{2+} -Imaging

7.1 Theorie des Ca^{2+} -Imagings

Eine Möglichkeit neuronale Aktivität nachzuweisen ist es, die sich dabei verändernde cytosolische Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen bildlich darzustellen. Fluoreszenzfarbstoffe können in zwei Gruppen unterteilt werden, in die wavelength stable dyes (wellenlängen-stabile Farbstoffe) und in die wavelength shifting dyes (wellenlängen-ändernde Farbstoffe). Bei ersteren Fluoreszenzindikatoren ändert sich durch Bindung von Ca^{2+} nur die Emissionsintensität, die Anregungs- und Emissionswellenlängen bleiben konstant.

Der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff Fura-2 zählt zu den wavelength shifting dyes. Wenn Ca^{2+} an den Farbstoff bindet, ändert sich dessen Anregungswellenlänge (siehe Abb. II-2). Für den an Ca^{2+} gebundenen Farbstoff liegt das Anregungsmaximum bei 340 nm. Das Anregungsmaximum des ungebundenen Fura-2 liegt bei 362 nm. In der Praxis wird allerdings nicht bei 362 nm gemessen, da dies sehr nah am isoemissiven Punkt des Fura-2-spezifischen Spektralverhaltens liegt. An diesem Punkt ist die Fluoreszenzintensität von Fura-2 unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration immer gleich. Gemessen wird stattdessen bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm. Hier ist die Differenz der Fluoreszenzintensität für Ca^{2+} -freies und Ca^{2+} -gebundenes Fura-2 am größten. Die Emission erfolgt sowohl beim gebundenen als auch beim ungebundenen Farbstoff bei der Wellenlänge 510 nm.

Weil gebundenes und freies Fura-2 bei unterschiedlichen Wellenlängen maximal angeregt wird, ist es möglich, sogenannte Ratio-Messungen (Verhältnis-Messungen) durchzuführen. Dabei findet zeitlich unmittelbar hintereinander abwechselnd eine Anregung bei 340 nm und 380 nm statt. Die jeweilige Emission bei 510 nm wird gemessen und daraus das Verhältnis (Ratio) gebildet. Im Fall von Fura-2 wird der Quotient aus der bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm gemessenen Emission gebildet. Diese Ratio-Messung bringt gegenüber der Einzelwellenlängen-Messung einige Vorteile mit sich. Die erfassten Werte der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sind dabei unabhängig von der absoluten Konzentration an Farbstoff in der Zelle. Auch Faktoren wie Zelldicke und Zellgröße spielen keine Rolle. Zudem werden Fehlermöglichkeiten, die durch Ausbleichen oder „Auslaufen“ des Farbstoffs aus der Zelle entstehen könnten, reduziert, da sie bei beiden

Wellenlängen die gleiche Auswirkung haben und so durch Bildung der Ratio entweder ganz wegfallen oder zumindest minimiert werden (Tsien & Poenje 1986).

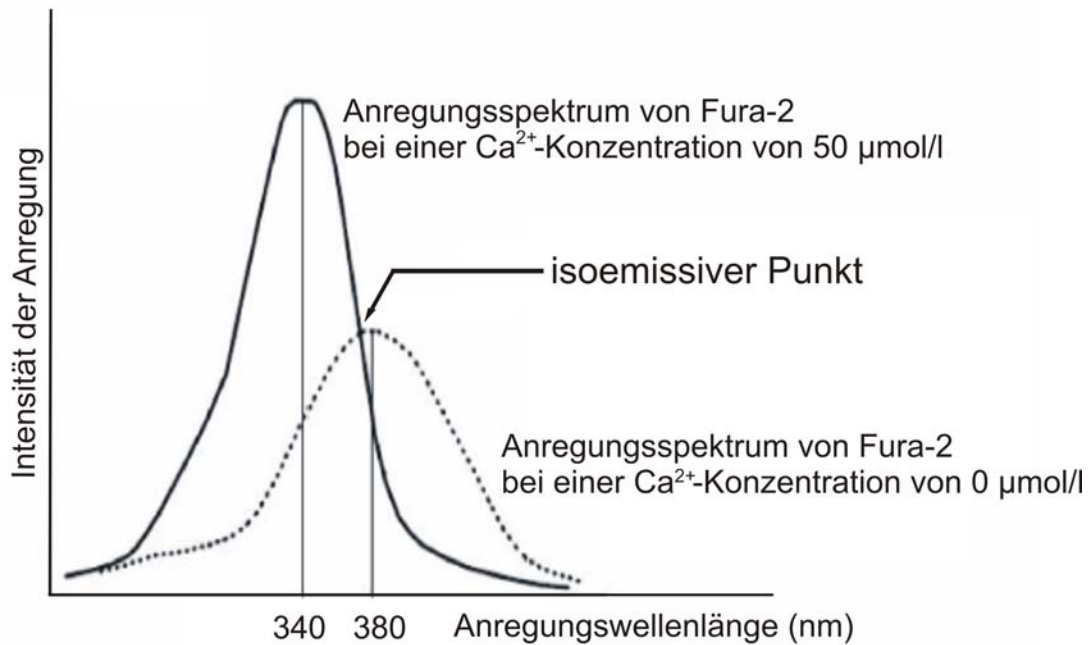


Abb. II-2: Anregungsspektren von Fura-2 bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen

Die Messung der Emission erfolgt bei 510 nm.

7.2 Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2

Fura-2 ist ein Fluoreszenz-Indikator-Farbstoff mit der Grundstruktur eines Ca^{2+} -Chelators, genauer einer EGTA-Grundstruktur. Diese Struktur verleiht dem Farbstoff eine sehr hohe Selektivität für Ca^{2+} -Ionen, wodurch die Bildung eines Chelator-komplexes aus Fura-2 und Ca^{2+} möglich wird. Die Bindungskurve verläuft sigmoidal und ist in Abbildung II-3 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration dargestellt. Die Dissoziationskonstante (K_d) ist der Wert, bei dem 50 % des Fura-2 an Ca^{2+} gebunden ist. Je kleiner der K_d -Wert, desto stärker ist die Affinität des Farbstoffs für das Ziel-Ion. Für Fura-2 liegt der K_d -Wert bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 224 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. In den meisten Zellen liegt die Konzentration an freiem Ca^{2+} unter Ruhebedingungen nur bei etwa 100 $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dieser Bereich ist durch das graue Quadrat in Abbildung II-3 gekennzeichnet. Das bedeutet, dass bei einer Erhöhung der Ca^{2+} -

Konzentration auf einen Stimulus hin noch genug Spielraum nach oben besteht, bevor eine Sättigung des Farbstoffs eintritt.

Damit Fura-2 überhaupt in das Cytosol der zu untersuchenden Zellen gelangt, bedient man sich der AM-Form des Farbstoffs (AM = Acetoxymethylester). Diese Form ist nicht fluoreszent, ungeladen und damit lipophil, d.h. membranpermeabel, sodass der Farbstoff in das Cytosol der Zelle diffundieren kann. Dort spalten zelleigene, unspezifische Esterasen die Esterbindungen auf und es entsteht die freie Säureform des Farbstoffs. Das nun geladene Fura-2 ist fluoreszent und membranimpermeabel, kann also nicht mehr aus der Zelle heraus diffundieren (Tsien & Poenje 1986). Der nicht in die Zellen aufgenommene Farbstoff kann durch Waschen entfernt werden.

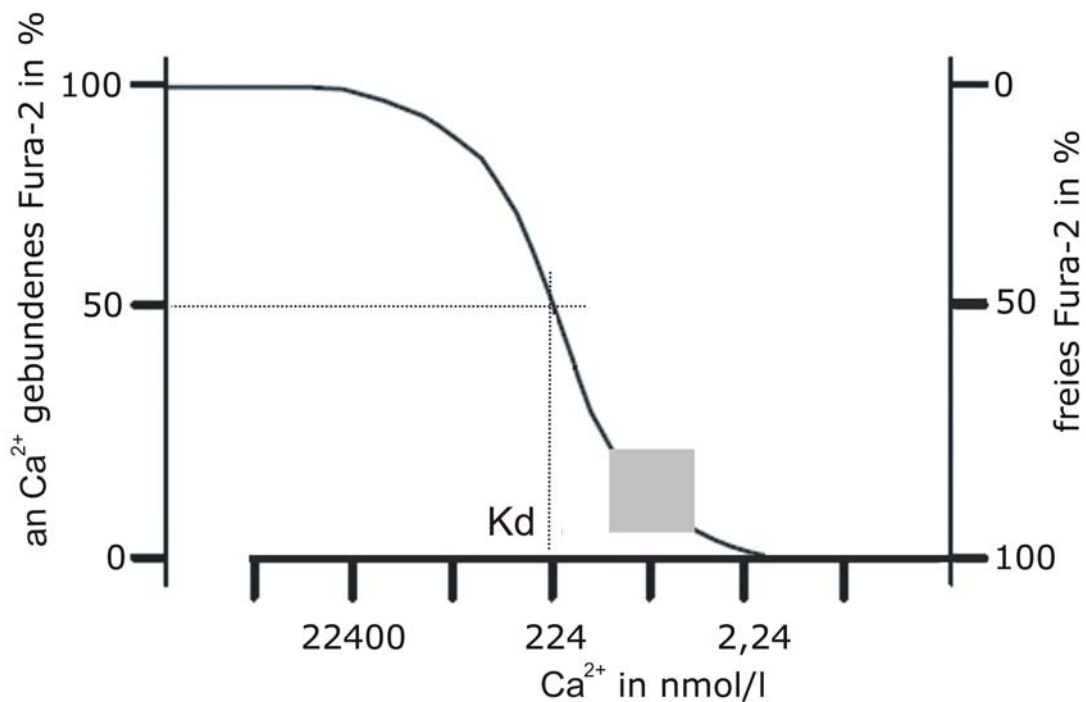


Abb. II-3: Bindung von Ca^{2+} an den Fluoreszenzindikator Fura-2 in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration

Das graue Quadrat zeigt den Bereich, in dem die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration unter Ruhebedingungen liegt. K_d = Dissoziationskonstante

7.3 Der Ca^{2+} -Imaging-Messstand

Die Fura-2-Messungen wurden mit einem inversen Lichtmikroskop IX 50 von Olympus durchgeführt, welches mit einem Epifluoreszenz-Setup und einer Imageanalyse-Software (Till Photonics, Martinsried, Deutschland) ausgestattet war. Als Lichtquelle diente eine Xenonlampe. Die erzeugten Lichtwellen wurden über einen Spiegel in den Lichtleiter gelenkt. Über einen dichromatischen Spiegel wurde das Anregungslicht auf das Objekt geleitet. Durch Anregung des Farbstoffs mit Licht der Wellenlänge 340 bzw. 380 nm wurde eine Emission bei 510 nm erzeugt, die den dichromatischen Spiegel passieren konnte. Das emittierte Licht wurde von einer CCD-Kamera (charge coupled device; Till Photonics, Martinsried, Deutschland) aufgenommen und an einen Computer gesendet. Durch einen beweglichen Spiegel konnte das Licht alternativ zum Auge oder zur Kamera weitergeleitet werden. Abbildung II-4 zeigt den Aufbau des Fura-2-Messstands.

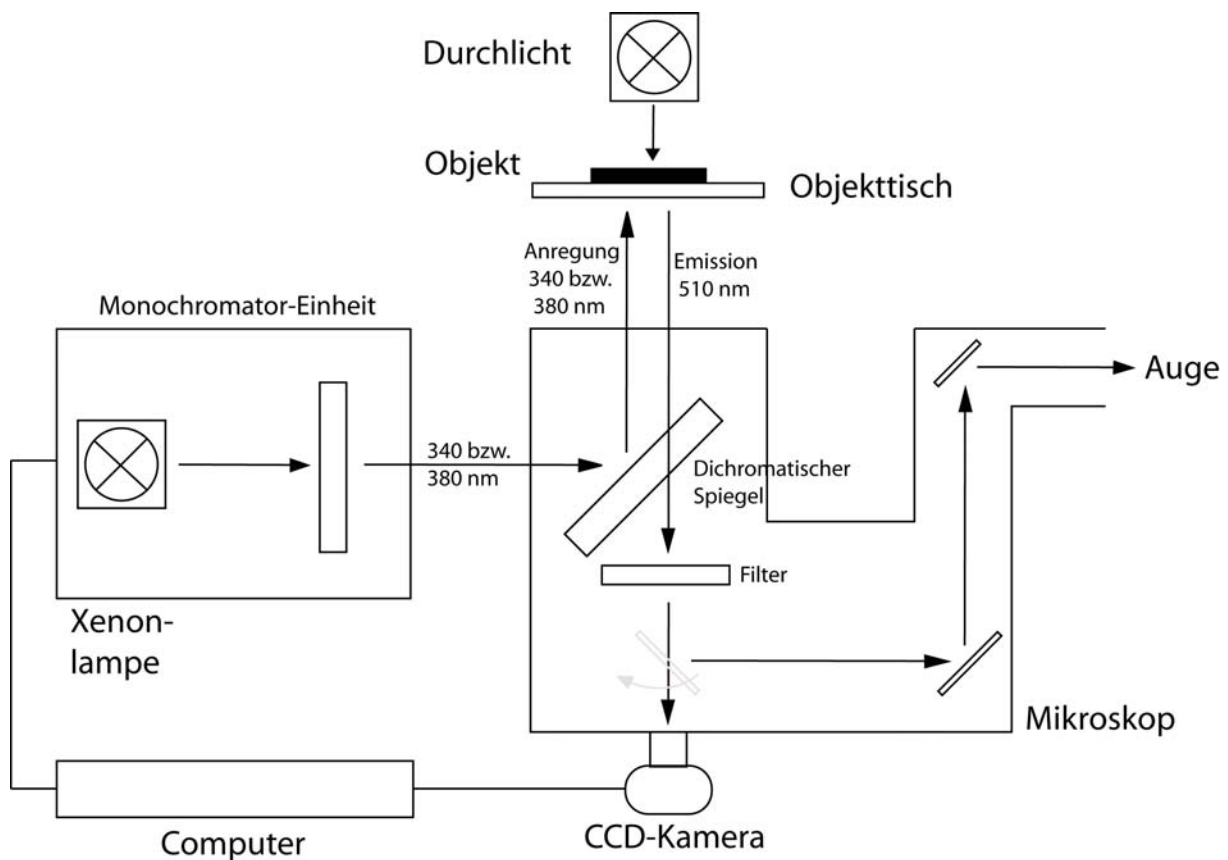


Abb. II-4: Aufbau des Ca^{2+} -Imaging-Messstands

7.4 Die Imaging-Messkammer mit Perfusionsystem

Die Messkammer bestand aus einer Metallplatte mit einer kreisrunden, im Durchmesser 1,8 cm großen Aussparung in der Mitte, auf die das Glasplättchen mit dem Gewebestück aufgelegt werden konnte. Zur Befestigung des Glasplättchens wurde ein Teflon-Ring mit gleicher Öffnung auf die Metallplatte aufgesteckt und festgeschraubt. Durch die Form des Teflonrings konnten oberhalb des Glasplättchens bis zu 3 ml Flüssigkeit zugegeben werden. Die gesamte Vorrichtung konnte nun auf dem Objektisch fixiert und an ein Perfusionsystem angeschlossen werden. Die ständige Perfusion mit frischer Tyrodelösung erfolgte durch einen mittels einer Schlauchpumpe (Typ 11OSC.G18.CH5B, Ole Dich Instrumentmakers APS, Hvidovre, Dänemark) gesteuerten Zu- und Ablauf. Die Geschwindigkeit der Perfusion wurde auf 1,5 ml/min eingestellt.

7.5 Durchführung und Auswertung der Ca^{2+} -Messungen

Alle Ca^{2+} -Imaging-Versuche wurden an Neuronen innerhalb des intakten Häutchenpräparats des Plexus submucosus durchgeführt. Dazu wurde das Gewebe mit Fura-2 AM ($11,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und 0,05 % (Vol/Vol) Pluronic für 1 h bei Raumtemperatur aufgeladen (siehe II-2.2.2). Pluronic ist ein Detergenz, welches die Löslichkeit von Fura-2 AM verbessert. Um den nicht aufgenommenen Farbstoff zu entfernen, folgte ein Waschschrift. Die Inkubation mit Fura-2 sowie alle folgenden Schritte fanden unter Lichtschutz statt. Die Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen, auf denen die aufgeladenen Submucosa-Präparate aufgebracht waren, wurden in die Messkammer eingespannt und auf dem Objektisch befestigt. Das Auswählen eines geeigneten Ganglions erfolgte am Mikroskop unter UV-Licht, da im Durchlicht keine Neuronen bzw. Ganglien erkennbar waren. Der ausgewählte Bereich war auf dem Computerbildschirm in Falschfarben dargestellt. Anhand dieser Darstellung wurde für jedes einzelne Neuron manuell ein Messbereich (ROI = region of interest) festgelegt (Abb. II-5).

Zu Beginn der Versuche wurde das Gewebe mit normaler Tyrodelösung superfundiert und währenddessen einige Minuten lang eine Baseline aufgenommen. Nach Stabilisierung des Fluoreszenz-Signals wurde eine Tyrodelösung, die Bradykinin ($2 \cdot 10^{-10} - 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) enthielt, appliziert und die Veränderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beobachtet, sowie für die spätere Auswertung aufgezeichnet. Inhibitoren wurden mindestens 5 Minuten

vor Zugabe von Bradykinin appliziert. In Versuchen mit Agonisten ersetzen diese Bradykinin. Die Reaktion auf Bradykinin oder einen Agonisten musste folgende zwei Bedingungen erfüllen, um als Zellantwort akzeptiert zu werden: 1. Die Amplitude des Ratio-Anstiegs musste die 4-fache Standardabweichung der Schwankung der Baseline übersteigen. 2. Die Amplitude des Ratio-Anstiegs musste einen absoluten Wert von 0,1 überschreiten.

Am Ende jeden Experiments wurde als Vitalitätskontrolle eine Stimulation entweder mit Carbachol, KCl oder Cyclopiazonsäure (CPA) durchgeführt. Carbachol führt sowohl über den metabotropen G_q -Protein-gekoppelten M-Rezeptor als auch über den ionotropen N-Rezeptor zu einer cytosolischen Ca^{2+} -Erhöhung. KCl depolarisiert die Zelle, wodurch es ebenfalls zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration kommt. CPA verhindert die Wiederaufnahme von cytosolischen Ca^{2+} -Ionen in das endoplasmatische Reticulum und sorgt so unabhängig von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für einen Ca^{2+} -Anstieg.

Zur Datenerfassung und zur Steuerung des Versuchsablaufs wurde die Imaginganalyse-Software TILLvisION verwendet. Das Protokoll legte fest, dass alle 2 Sekunden eine Belichtung mit beiden Anregungswellenlängen (340 nm und 380 nm) vorgenommen und jeweils die Emission aufgezeichnet wurde. Die Belichtungsdauer betrug 60 - 120 ms. Damit Zellen und Farbstoff stets nur mit so viel Licht belastet wurden wie nötig war, wurde die Belichtungsdauer bei jeder Messung der Fluoreszenzstärke angepasst. Während des gesamten Versuchs konnten die emittierten Fluoreszenzsignale am Computerbildschirm verfolgt werden. Das Programm errechnete zudem gleichzeitig die Ratio aus der Emission beider Anregungswellenlängen, sodass die Wirkung einer Substanzzugabe auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration direkt beobachtet werden konnte. Stieg die Ca^{2+} -Konzentration an, stieg auch die Kurve des Ratio-Signals, umgekehrt sank das Signal ab, wenn die Ca^{2+} -Konzentration geringer wurde. Alle erfassten Werte wurden gespeichert und danach mit verschiedenen Datenanalyse-Programmen ausgewertet.

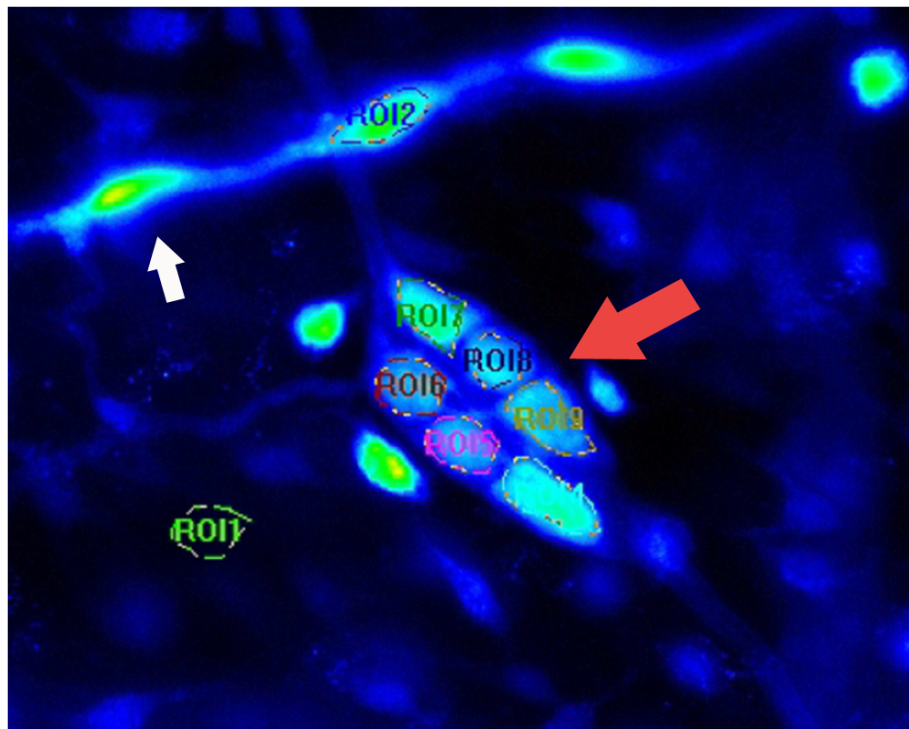


Abb. II-5: Falschfarbendarstellung eines mit Fura-2 aufgeladenen Ganglions innerhalb des intakten Häutchenpräparats des Plexus submucosus

Das Ganglion (roter Pfeil) besteht aus sechs einzelnen Neuronen. Der Messbereich wurde für jede Zelle des Ganglions und zu Kontrollzwecken für eine zellfreie Region individuell durch Markieren von sog. ROIs (regions of interest) festgelegt. Die Fura-2-Ratio wurde für jede ROI berechnet und ausgewertet. Der weiße Pfeil markiert eine Zelle innerhalb eines kleineren Blutgefäßes, welches sich im oberen Teil des Bildes befindet.

8 Patch-Clamp-Technik

8.1 Grundlagen der Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Methode (Neher & Sakmann 1992) wurde erstmals 1976 von Erwin Neher und Bert Sakmann beschrieben und ist heute eine sehr wichtige und weit verbreitete Methode, für deren Entdeckung sie den Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen bekamen. Bei der Patch-Clamp-Technik wird eine Glaspipette mit einer sehr kleinen Öffnung auf die Oberfläche einer Zelle aufgesetzt, wobei eine stabile Verbindung (Seal) zwischen der Pipettenöffnung und der Membran entsteht. Diese Seal-Bildung kann durch Anlegen eines schwachen Unterdrucks an der Pipette beschleunigt und verstärkt werden (Hamill et al. 1981).

Während der sogenannten Cell-Attached-Konfiguration ist die entstandene Verbindung so stabil, dass keine Ionen mehr zwischen der Zelle und der Pipette entweichen können. Die Stelle der Membran, die sich innerhalb der Pipettenöffnung befindet, ist physikalisch und elektrisch von ihrer Umgebung isoliert. Zwischen der Pipette und der Badlösung entsteht so ein elektrischer Widerstand von mehreren Gigaohm. In dieser Konfiguration können nun die Ionenströme, die über den Membranfleck innerhalb der Patchpipette fließen, gemessen werden.

Je nach Fragestellung können auch andere Messkonfigurationen angewendet werden (siehe II-8.1.2). Generell ist es mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik möglich, das Membranpotential einer Zelle und die über die Membran fließenden Ionenströme zu messen. Dabei kann der vergleichsweise große Gesamtstrom, der an der kompletten Zellmembran stattfindet, detektiert werden. Aber auch extrem geringe Ionenbewegungen, die durch nur einen einzigen Kanal vermittelt werden, sind messbar.

8.1.1 Verschiedene Mess-Konfigurationen

Nachdem die vorher beschriebene Cell-Attached-Konfiguration erreicht ist, kann die Membran durch Anlegen eines kurzen starken Unterdrucks innerhalb der Pipettenöffnung durchbrochen und die Zelle damit eröffnet werden. Der Gigaseal bleibt dabei intakt. Das Cytosol steht nun mit der Pipettenlösung in Kontakt und wird rasch durch diese ausgetauscht. Diese Anordnung wird Whole-Cell-Konfiguration genannt (Abb. II-6). Durch die Zusammensetzung der Pipettenlösung lassen sich also die cytosolischen Bedingungen je nach Fragestellung vordefinieren und zudem ermöglicht der Zugang zum Zellinneren elektrische Ableitungen über die ganze Membran. Zur Bearbeitung bestimmter Fragestellungen ist es weiterhin möglich, die elektrischen Eigenschaften der Zellmembran durch Anlegen einer Spannungsklemme (Voltage-Clamp) oder durch Applikation eines bestimmten Stroms (Current-Clamp) festzulegen. Der Whole-Cell-Modus eignet sich somit besonders gut für eine basale Charakterisierung von elektrischen Membraneigenschaften. Ein Nachteil der Whole-Cell-Ableitung besteht darin, dass second messenger oder cytosolische Enzyme durch das im Vergleich sehr große Volumen der Pipettenlösung stark verdünnt werden und das Cytoplasma dadurch seine natürliche Zusammensetzung verliert. In der Whole-Cell-Konfiguration wurden alle elektrophysiologischen Versuche dieser Arbeit durchgeführt. Dabei wurden das Membranpotential des Neurons und auch die gesamten, über die Zellmembran fließenden Ionenströme gemessen.

Die Outside-Out-Konfiguration kann ausgehend vom Whole-Cell-Modus erreicht werden. Durch Anheben der Pipette löst sich ein Teil der Membran ab und formt sich zu einem konvexen Membranstück um. Bei dieser Messanordnung steht die vormals extrazelluläre Seite der Membran mit der Badlösung in Kontakt und die vormals cytoplasmatische Seite mit der Pipettenlösung.

Die Inside-Out-Konfiguration wird ausgehend vom Cell-Attached-Modus durch vorsichtiges Zurückziehen der Pipette erreicht. Das Membranstück wird dabei aus der Zelle gelöst und verschließt die Pipettenöffnung. Die Seite, die zuvor mit dem Cytoplasma in Kontakt stand, befindet sich dann in der Badlösung. Dieser Modus eignet sich, wie der Cell-Attached-Modus auch, zur Untersuchung einzelner Ionenkanäle, wobei hier das Milieu durch die Badlösung bestimmt werden kann.

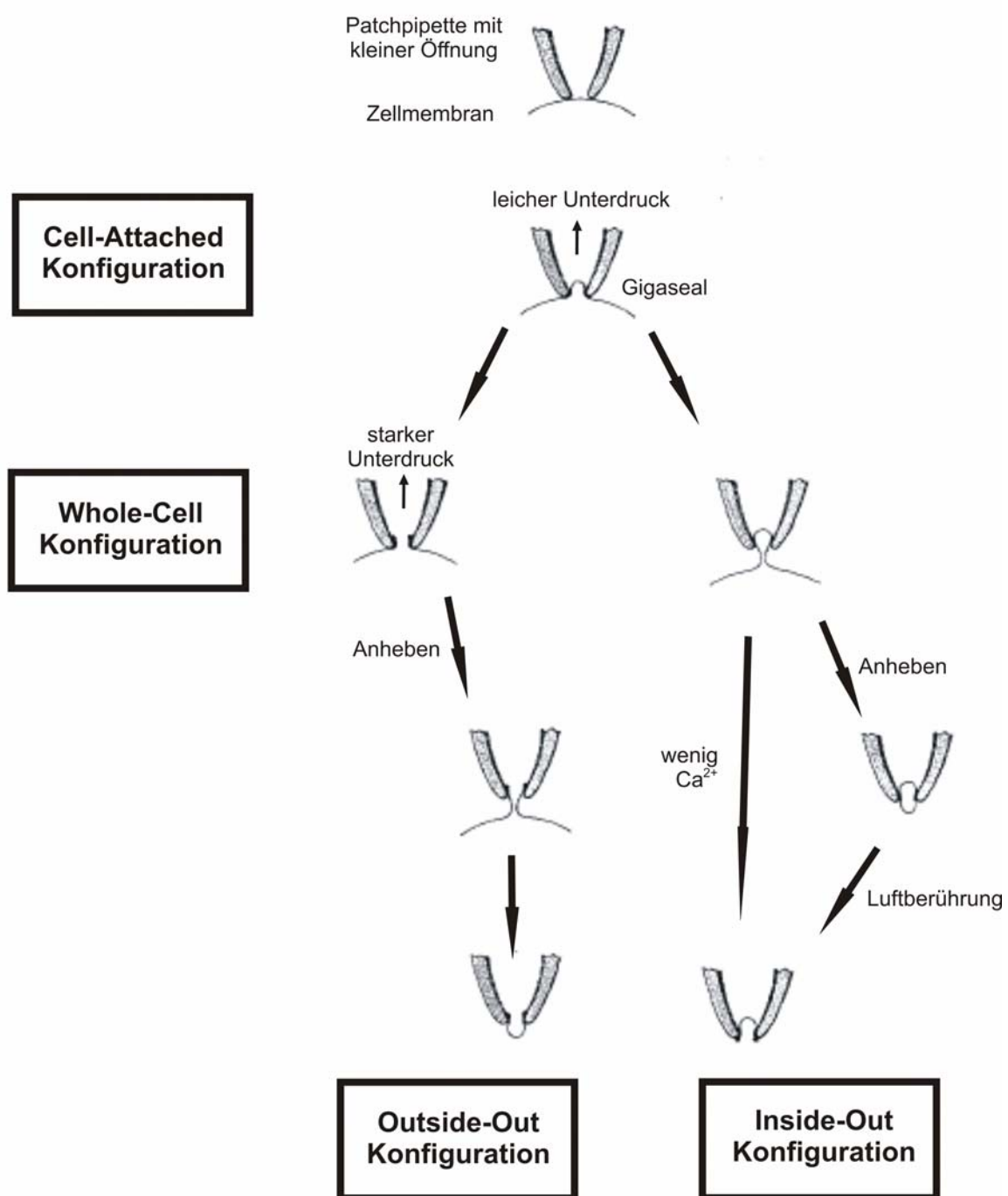


Abb. II-6: Modell der verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen

Nach dem Aufsetzen der Patchpipette auf die Zellmembran können folgende Messanordnungen hergestellt werden: Cell-Attached, Whole-Cell, Outside-Out und Inside-Out (Modifiziert nach Hamill et al. 1981).

8.2 Der Patch-Clamp-Messstand

8.2.1 Das Mikroskop

Für die Patch-Clamp-Versuche wurde ein inverses Mikroskop IX 70 von Olympus verwendet. Durch die inverse Anordnung, bei der sich die Objektive unterhalb des Objekttischs befanden, war oberhalb des Tisches genug Platz für die Pipette mit Pipettenhalter, den Vorverstärker (= Headstage), die Referenzelektrode samt Befestigung und die Perfusions- und Absauge-Vorrichtung. Das Mikroskop war mit einer Nomarski-Optik ausgestattet. Dabei handelt es sich um ein kontrastverstärkendes Verfahren mit sog. differentiellm Interferenzkontrast, bei dem dünne optische Schnitte durch das Präparat gelegt werden. Der Vorteil besteht darin, dass Strukturen, die über oder unter der Betrachtungsebene liegen, weniger stören und die zu untersuchenden Zellen so deutlicher dargestellt werden. Dies ist wichtig, da eine gute räumliche Darstellung der Zelle das langsame und kontrollierte Aufsetzen der Patchpipette auf die Zelloberfläche erleichtert.

8.2.2 Messkammer und Perfusionssystem

Die Messkammer bestand aus einem modifizierten Objektträger, der in der Mitte eine runde Vertiefung besaß, in die das Glasplättchen mit den Zellen eingelegt werden konnte. Innerhalb dieser Vertiefung wurden dann eine Zulauf- und eine Absauge-Vorrichtung platziert, um die Zellen während des Versuchs kontinuierlich zu superfundieren. Die Perfusionslösungen standen oberhalb der Messkammer und konnten so hydrostatisch ohne Verwendung einer Pumpe über Infusionsbestecke (LDKS Oversan Industria Biomedica, Mailand, Italien) zur Messkammer geleitet werden. Die Schläuche mit den verschiedenen Perfusionslösungen mündeten kurz vor der Messkammer in einen Verteiler, sodass ein Lösungswechsel die Kammer in wenigen Sekunden erreichte. Die Fließgeschwindigkeit betrug etwa 1 ml/min. An der dem Zulauf gegenüberliegenden Seite der Messkammer wurde der Absauger so positioniert, dass das Flüssigkeitsvolumen in der Kammer stets ca. 0,5 ml betrug.

8.2.3 Messtisch und mechanische Komponenten

Die empfindliche Verbindung zwischen Zelle und Patchpipette erforderte eine Vermeidung von mechanischen Schwingungen und Erschütterungen. Das wurde durch einen schwingungsgedämpften Tisch, auf dem das Mikroskop mitsamt der Messapparatur stand, erreicht. Um elektrische Felder abzuschirmen, war der Versuchsstand von einem Faraday-Käfig umgeben. Zur Bewegung der Patchpipette wurde ein hydraulischer Mikromanipulator (MHV-103, Narishige International, London, England) verwendet. Die Bedienungselemente des Mikromanipulators wurden separat vom schwingungsgedämpften Tisch angebracht, um jede mögliche Störung durch Erschütterungen zu vermeiden. Durch eine Schlauchverbindung konnte ein Über- oder Unterdruck an der Patchpipette, die in einen Pipettenhalter eingespannt war, erzeugt werden.

8.2.4 Elektronische Komponenten

Die Messung des Membranpotentials und der Membranströme erfolgte mit Hilfe eines Patch-Clamp-Verstärkers (RK 400, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich), der mit einem sog. Low-pass-Filter (AF-180, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) von 3 kHz ausgestattet war, um das hochfrequente Rauschen der gemessenen Signale zu reduzieren. Der dazugehörige Vorverstärker (HK 409, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich), auch Headstage genannt, wurde auf dem Mikromanipulator befestigt und stand mit dem Verstärker in Verbindung. Der Verstärker war mit einem Digital-Analog/Analog-Digital-(DA-AD)-Wandler (Digidata 1322A, Axon Instruments, Foster City, Kalifornien, USA) mit einem Computer verbunden und wurde über eine spezielle Software (pClamp 8.2, Axon Instruments, Foster City, Kalifornien, USA) gesteuert.

Über diese Software ließ sich eine Kommandospannung anlegen, zum Beispiel konnte ein konstantes Haltepotential oder eine Pulsabfolge festgelegt werden. Dieses Signal musste mit Hilfe eines DA-AD-Wandlers von der digitalen in die analoge Form umgewandelt werden und konnte dann in den Verstärker eingespeist werden. So konnten an der Pipette Spannungen zwischen -200 mV und +200 mV angelegt und die dabei fließenden Ionenströme gemessen werden. Das Anlegen einer bestimmten Spannung wird auch „klemmen“ (englisch: clamp) genannt, daher die Bezeichnung Voltage-Clamp. Umgekehrt kann auch ein konstanter Strom

festgelegt und die Spannung gemessen werden. Mit dieser als Current-Clamp bezeichneten Methode lässt sich das Membranpotential untersuchen.

Der Verstärker arbeitet nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung. Hierbei wird der tatsächliche Wert des Membranpotentials oder des fließenden Stroms mit den jeweiligen eingestellten Sollwerten verglichen. Tritt zwischen dem Soll- und Ist-Wert eine Differenz auf, wird ein Kompensationsstrom generiert, bis diese Differenz ausgeglichen ist. Der Kompensationsstrom ist also genauso groß wie der Strom, der durch die Zellmembran fließt, ist diesem aber entgegengesetzt. Zudem ist der Kompensationsstrom direkt proportional zur Leitfähigkeit der Membran, die sich dadurch leicht berechnen lässt.

Um Spannungsmessungen und Strominjektionen (oder Strommessungen und Anlegen einer Spannung) mit nur einer Pipette durchführen zu können, musste ein Strom-Spannungswandler vorhanden sein. Er befand sich direkt hinter der Pipette im Vorverstärker. An den Verstärker war ein Oszilloskop (HM-205-3 HAMEG Instruments, Frankfurt, Deutschland) angeschlossen, auf dessen Bildschirm Strom und Spannung abgebildet waren.

8.3 Die Elektroden

Die verwendete Referenzelektrode im Bad und auch die Messelektrode innerhalb der Patchpipette waren Silber/Silberchloridelektroden. Die an den Vorverstärker gekoppelte Referenzelektrode wurde über eine Agarbrücke ($3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KCl} + 3 \% \text{ Agar (Gew/Vol)}$) mit der Badlösung verbunden. Die Messelektrode war ebenfalls an den Vorverstärker gekoppelt und befand sich innerhalb der Pipette. Die Potentialdifferenz zwischen den beiden Elektroden soll immer Null ergeben, wenn sie in eine Chloridlösung derselben Konzentration getaucht werden. Um das zu erreichen, wurden die Silberdrähte, aus denen die Elektroden bestehen, mit einer gleichmäßigen Chloridschicht überzogen. Dazu wurden die Elektroden mit feinem Sandpapier abgeschliffen, mit Alkohol gereinigt und getrocknet. Dann wurde der Silberdraht an die Anode einer 4,5 V Batterie angeschlossen und in eine 3 molare KCl-Lösung getaucht, in der sich auch die Kathode der Batterie befand. Es kommt dabei zu folgender chemischer Reaktion:



Durch Entfernen der Elektronen (e^-) verschiebt sich das Reaktionsgleichgewicht auf die rechte Seite und am Silberdraht der Anode bildet sich eine Silberchloridschicht. Gleichmäßig chlorierte Elektroden erscheinen matt grau.

8.4 Die Patchpipetten

Die Patchpipetten wurden kurz vor Versuchsbeginn aus Borosilikatglas (Jencons Scientific, Bedfordshire, England) mit einem Innendurchmesser von 1,15 mm und einem Außendurchmesser von 1,8 mm hergestellt. Um die Silberchloridschicht der Messelektrode und das Dichtungsgummi im Pipettenhalter zu schonen, wurden die Enden der Kapillaren nach dem Zuschneiden mit einem Bunsenbrenner rundgeschmolzen. Es folgte ein zweistufiges Ausziehen der Glaskapillare mit einem Vertikalpuller (Typ PC 95, Hans Ochotzki, Feinmechanik, Homburg/Saar, Deutschland). Bis zum Versuchsbeginn lagerten die fertigen Patchpipetten in einer geschlossenen, vor Staub geschützten Box. Erst unmittelbar vor dem Versuch wurde die Pipette mit einer definierten Pipettenlösung befüllt, wobei unbedingt darauf zu achten war, dass keine Luftblasen zurück blieben.

Der Widerstand der Pipetten ist abhängig von der Pipettenspitzenöffnung und der Form der Flanken (Numberger & Draguhn 1996). Durch Variieren der Temperatur der Heizspirale, Zeitdauer des Zugvorgangs und Distanz der Zuglänge konnte die jeweils erforderliche Pipettenform hergestellt werden. Die Pipettenspitzenöffnung der verwendeten Pipetten betrug ca. 1 μm und der Pipettenwiderstand 5 - 8 $\text{M}\Omega$. Vor Beginn des Versuchs wurde der Widerstand mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes ($R = U/I$) aus dem Spannungspuls (50 mV) und des sich daraus ergebenden Stroms, der am Oszilloskop abgelesen werden konnte, berechnet.

8.5 Vorzeichenkonvention

Ein negativer Strom fließt per Definition dann, wenn entweder positiv geladene Ionen in die Zelle hinein gelangen oder wenn negativ geladene Ionen aus der Zelle heraus fließen. Positive Ströme werden demnach genau umgekehrt durch hineinströmende negative Ionen und herausströmende positive Ionen erzeugt.

8.6 Datenerfassung

Zur Erfassung und Speicherung der gemessenen analogen, low-pass-gefilterten Daten waren verschiedene Geräte an den Hauptverstärker angeschlossen. Ein Papierschreiber (L 250 E, Phywe Systeme, Düsseldorf, Deutschland) zeichnete kontinuierlich während der gesamten Messung entweder die Spannung, also das Membranpotential, oder den Strom, der die Ionenbewegungen über der Membran darstellt, auf. Die gemessenen Strom- und Spannungswerte waren analog, wurden jedoch zusätzlich zu den Schreiberaufzeichnungen mit Hilfe des DA-AD-Wandlers digitalisiert und von einem digitalen Kassettenrekorder (DTR 1204, Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich) aufgenommen. Diese Daten konnten anschließend von der Kassette abgespielt und unter Verwendung eines beliebigen Filters (hier: 3 kHz) auf der Festplatte des Computers gespeichert werden. Durch diese Methode standen alle gemessenen Daten neben dem analogen Ausdruck des Schreibers auch in digitaler Form zur Verfügung und konnten so exakt ausgewertet werden. Die Datenerfassung erfolgte mit einer speziellen Software (pClamp 8.2, Axon Instruments, Foster City, USA). Die Frequenz, mit der die Daten gesammelt wurden, betrug 10 kHz.

8.7 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente

Zu Beginn jedes Experiments musste ein Neuron innerhalb der submucösen Primärkultur identifiziert werden. Schwierigkeiten ergaben sich dabei aus der Tatsache, dass die Nervenzellen nur einen sehr geringen Anteil der Zellpopulation ausmachten und zum Teil sehr schwer von den anderen Zelltypen zu unterscheiden waren. Zunächst wurde unter mikroskopischer Kontrolle eine geeignete Zelle, von der angenommen wurde, dass es sich um ein Neuron handelte, ausgewählt. Wichtig war dabei, dass die Zelle gut auf dem Untergrund haftete oder im Idealfall auf anderen Zellen, die oftmals einen Zellrasen bildeten, angewachsen war.

Als nächstes wurde die Patchpipette mit der Pipettenlösung befüllt, durch leichtes Klopfen von allen Luftblasen befreit und schließlich in den Pipettenhalter eingespannt. Gesteuert durch den Mikromanipulator tauchte die Patchpipette in die Badlösung ein und näherte sich der Zelle. Dabei befand sich ein leichter Überdruck auf der Pipette, so dass der ständige Ausstrom von Pipettenlösung aus der Pipettenspitze Zelltrümmer und sonstige

Verschmutzungen wegspülte und ein Verstopfen der Pipettenöffnung verhinderte. Durch das Eintreten der Pipette in die Badlösung entstand ein als Offsetpotential bezeichnetes Messartefakt. Kurz bevor die Pipette Kontakt zur Zelle bekam, wurde eine Korrektur dieses Offsetpotentials vorgenommen. Dazu musste in den Modus, in dem keine Spannung an der Pipette angelegt war, gewechselt werden und der durch die Pipette fließende Strom am Verstärker auf Null eingestellt werden.

Anschließend wurde wieder in den Voltage-Clamp-Modus geschaltet und ein rechteckförmiger Kommandospannungspuls von 50 mV für je 30 ms erzeugt. Unmittelbar bevor die Spitze der Pipette die Zelloberfläche in der Mitte des Somas berührte, wurde der Überdruck abgelassen und die Pipette vorsichtig auf das Neuron herabgelassen. Das Aufsetzen der Pipette konnte am Oszilloskop oder am Computerbildschirm beobachtet werden. Sobald die Pipette die Zelloberfläche berührte, entstand eine lockere Verbindung zur Zellmembran, d.h. der Abdichtwiderstand der Pipette vergrößerte sich und der rechteckförmige Strom nahm geringfügig ab. Durch Anlegen eines leichten Unterdrucks an der Pipette sank der Strom schnell weiter ab, bis auch in hoher Auflösung nur noch eine Linie mit zwei kapazitiven Artefakten erkennbar war. Nun war der Cell-Attached-Modus erreicht, der Membranfleck unter der Pipettenöffnung war elektrisch isoliert und es lag ein Widerstand im Gigaohm-Bereich vor.

Da alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen in der Whole-Cell-Konfiguration stattfanden, war der nächste Schritt das Aufbrechen der Zellmembran. Bevor das geschah, wurde das Haltepotential auf -80 mV geklemmt. Mittels eines starken, ruckartig applizierten Unterdrucks konnte die Zelle durch Aufbrechen des Membranstücks, das sich innerhalb der Pipettenöffnung befand, geöffnet werden. Da die Membran submucöser Neurone im Gegensatz zu den ebenfalls in der Kultur vorkommenden Fibroblasten relativ schwer zu durchbrechen war, wurde der dazu nötige Unterdruck mit einer modifizierten großlumigen (50 ml) Spritze erzeugt (siehe Li 2008). Das erfolgreiche Aufbrechen der Zellmembran war daran zu erkennen, dass plötzlich ein charakteristisches Stromsignal statt der geraden Linie auftrat - der Whole-Cell-Modus war erreicht. Abbildung II-7 zeigt die mikroskopische Darstellung eines „gepatchten“ submucösen Neurons, das sich in dieser Konfiguration befindet.

Um zweifelsfrei zu bestätigen, dass es sich bei der Zelle tatsächlich um eine Nervenzelle und nicht etwa um eine Gliazelle oder einen Fibroblasten handelte, wurde eine Strom-Spannungskurve (IV-Kurve) aufgezeichnet. Eine im Voltage-Clamp-Modus aufgenommene IV-Kurve stellt die Ströme dar, die während verschiedener definierter Haltepotentiale fließen.

In diesem Fall wurden ausgehend von einem Haltepotential von -80 mV siebzehn Rechteckimpulse von 30 ms Dauer appliziert. Bei jedem Durchgang erhöhte sich die Klemmspannung um 10 mV, bis +80 mV erreicht waren. Durch die Erstellung einer IV-Kurve ließ sich die Zelle sicher als Neuron identifizieren (siehe Abb. III-25), denn nur in erregbaren Zellen wie Neuronen entsteht bei ausreichend positiven Spannungspulsen ein charakteristischer transienter negativer Strom. Gemäß der Vorzeichenkonvention (siehe II-8.5) repräsentiert ein negativer Strom den Flux positiv geladener Ionen in das Zellinnere. Dies ist in Neuronen dann der Fall, wenn eine überschwellige Erregung stattfindet, d.h. ein bestimmtes Membranpotential überschritten wird, und es durch Öffnung von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen zu einem Einstrom von Na^+ -Ionen und damit zur Entstehung eines Aktionspotentials kommt. In Gliazellen oder in Fibroblasten fließt bei keinem Haltepotential ein transienter negativer Strom, da kein Aktionspotential gebildet wird.

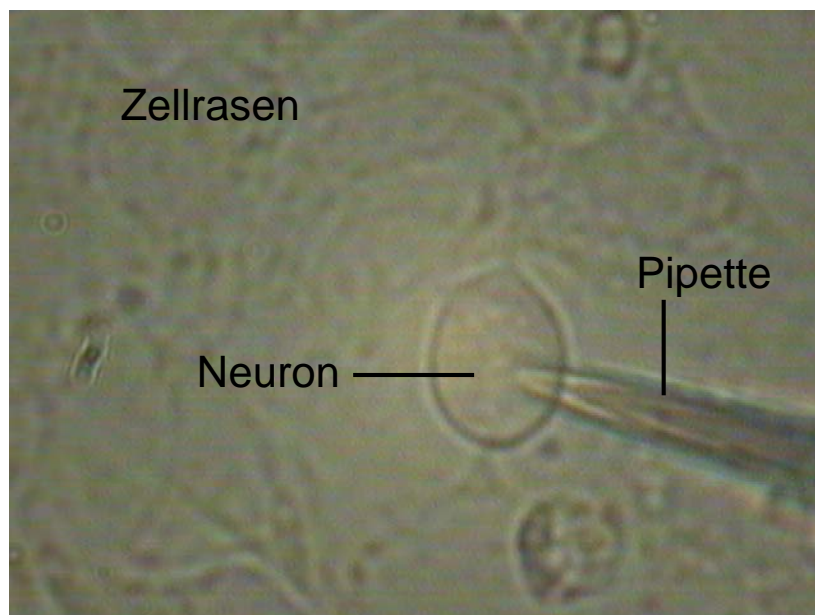


Abb. II-7: Mikroskopische Ansicht eines Neurons im Whole-Cell-Modus

Auf einer Schicht aus submucösen Zellen angewachsenes Neuron

Je nach Fragestellung variierte die weitere Vorgehensweise nach Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration. In dieser Arbeit wurden das Ruhemembranpotential, das durch die Zugabe von Bradykinin veränderte Membranpotential und der über die Membran fließende Strom vor und während der Bradykinin-Zugabe bei unterschiedlichen vorgegebenen Membranpotentialen untersucht. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

8.7.1 Messung des Membranpotentials

Um das Membranpotential messen zu können, musste der Verstärker auf einen Modus gestellt werden, bei dem der Strom durch die Membran auf Null eingestellt war. Zu Beginn des Versuchs wurde das Ruhemembranpotential der Neurone bestimmt und im weiteren Versuchsverlauf der Effekt von Bradykinin auf das Membranpotential.

8.7.2 Messung der Ionenströme

Um zu untersuchen, welche Ionen bzw. Ionenkanäle an der Bradykinin-Antwort beteiligt sind, wurden die Neurone im Voltage-Clamp-Modus auf unterschiedliche Membranpotentiale geklemmt und der dabei fließende Strom gemessen. Die Spannung vorgeben zu können, bietet besonders bei der Untersuchung von spannungsabhängigen Kanälen, aber auch bei solchen Kanälen, die nicht durch Spannungsänderungen kontrolliert werden, wie den ligandengesteuerten Kanälen, einige Vorteile. Bei beiden Ionenkanalarten kann die jeweilige angelegte Spannung den durch den Kanal fließenden Strom beeinflussen, da die Spannung die Antriebskraft der Ionenbewegung vorgibt. So ist es möglich, den zu untersuchenden Kanal auf dessen Umkehrpotential zu klemmen und damit den Nettofluss des gewünschten Ions auszuschalten. Dazu muss ein Haltepotential gewählt werden, welches nahe am jeweiligen Umkehrpotential des betreffenden Ions liegt. Dieses Potential wird auch Gleichgewichtspotential oder Nernstpotential genannt. Es ist abhängig von den intra- und extrazellulären Ionen-Konzentrationen. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung lässt sich für jedes Ion das jeweilige Umkehrpotential berechnen:

Nernstgleichung
$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln \frac{[Ion]_a}{[Ion]_i}$$

E = Gleichgewichtspotential (V)

R = Gaskonstante ($8,3143 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T = Versuchstemperatur (Kelvin)

z = Ladung des betreffenden Ions

F = Faraday-Konstante ($96478 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

$[]_a / []_i$ = Konzentration des Ions auf der Außen- bzw. Innenseite der Membran ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

8.7.3 Pulsprotokoll zur Messung der Ionenströme

Um die Beteiligung der verschiedenen Ionen gleichzeitig in einem Experiment untersuchen zu können, wurde ein Doppelpuls-Protokoll angewendet. Das Protokoll erzeugte abwechselnd je fünf Sekunden andauernde Haltepotentiale von -81 mV und 0 mV. Das Haltepotential von -81 mV ist das Umkehrpotential von K^+ . Es wurde mit der in II-8.7.2 beschriebenen Nernstgleichung berechnet. Während dieses Potential vorlag, konnte keine Nettobewegung von K^+ -Ionen stattfinden. Durch das Haltepotential von 0 mV, welches nahe am Umkehrpotential von unselektiven Kationenkanälen liegt, wurden die Na^+ -Ströme ausgeschaltet.

9 Immunfluoreszenz-Analyse

9.1 Grundlagen der Immunfluoreszenz

Voraussetzungen für die immunhisto- und immunocytochemischen Fluoreszenz-Markierungen sind das Vorhandensein von antigenen Strukturen auf den zu untersuchenden Gewebe oder Zellen und die Verfügbarkeit von hochspezifischen Antikörpern, die an das gesuchte Antigen binden können. Die Antikörper sind meist vom IgG-Typ und können mono- oder polyklonal sein. Sie bestehen aus zwei Antigen-bindenden Regionen, auch als Fab (fragment antigen binding) bezeichnet, und einer kristallinen Region (Fc abgekürzt). Die Fab-Regionen sind in der Lage, spezielle Determinanten (Epitope) der Antigene zu erkennen und daran zu binden. Nur ein für das gesuchte Antigen spezifischer Antikörper kann an das Antigen binden, wobei ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht, der durch multiple, nichtkovalente Bindungen zusammengehalten wird (Harlow & Lane 1988).

Der histologische Nachweis dieser Komplexe kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei dem direkten Nachweis ist der Antikörper mit einem visuell detektierbaren Liganden gekoppelt. Bei der indirekten Nachweismethode besitzt der primäre Antikörper keine solche Kopplung mit einem detektierbaren Liganden. In diesem Fall bindet ein sekundärer, an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper an den unmarkierten primären Antikörper. Dieser gesamte Komplex, bestehend aus einem Antigen, dem primären und dem sekundären Antikörper, kann schließlich mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops lokalisiert werden (Coons 1958). Im Gegensatz zum direkten Nachweis ist bei dieser Methode durch die höhere Sensitivität und die geringere Hintergrundfärbung eine Mehrfachmarkierung von verschiedenen Antigenen möglich. Ein Nachteil beider Arten von Fluoreszenzmarkierungen besteht in dem relativ raschen Ausbleichen der Fluorochrome bei Anregung im UV-Bereich. Dies kann durch spezielle Einbettmedien wie z.B. Citiflour® (Newby Castleman, Leicester, England) zeitlich etwas verzögert werden (Janeway & Travers 1997).

In dieser Arbeit wurden mit der indirekten Methode Doppel- oder Dreifachmarkierungen durchgeführt. Dabei war darauf zu achten, dass die Primärantikörper aus verschiedenen Wirtstieren stammen und die Sekundärantikörper an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind (Abb. II-8). Die Immunfluoreszenzmarkierungen hatten das Ziel, neuron- bzw. gliaspezifische Zelloberflächenproteine und Bradykinin-Rezeptorproteine nachzuweisen.

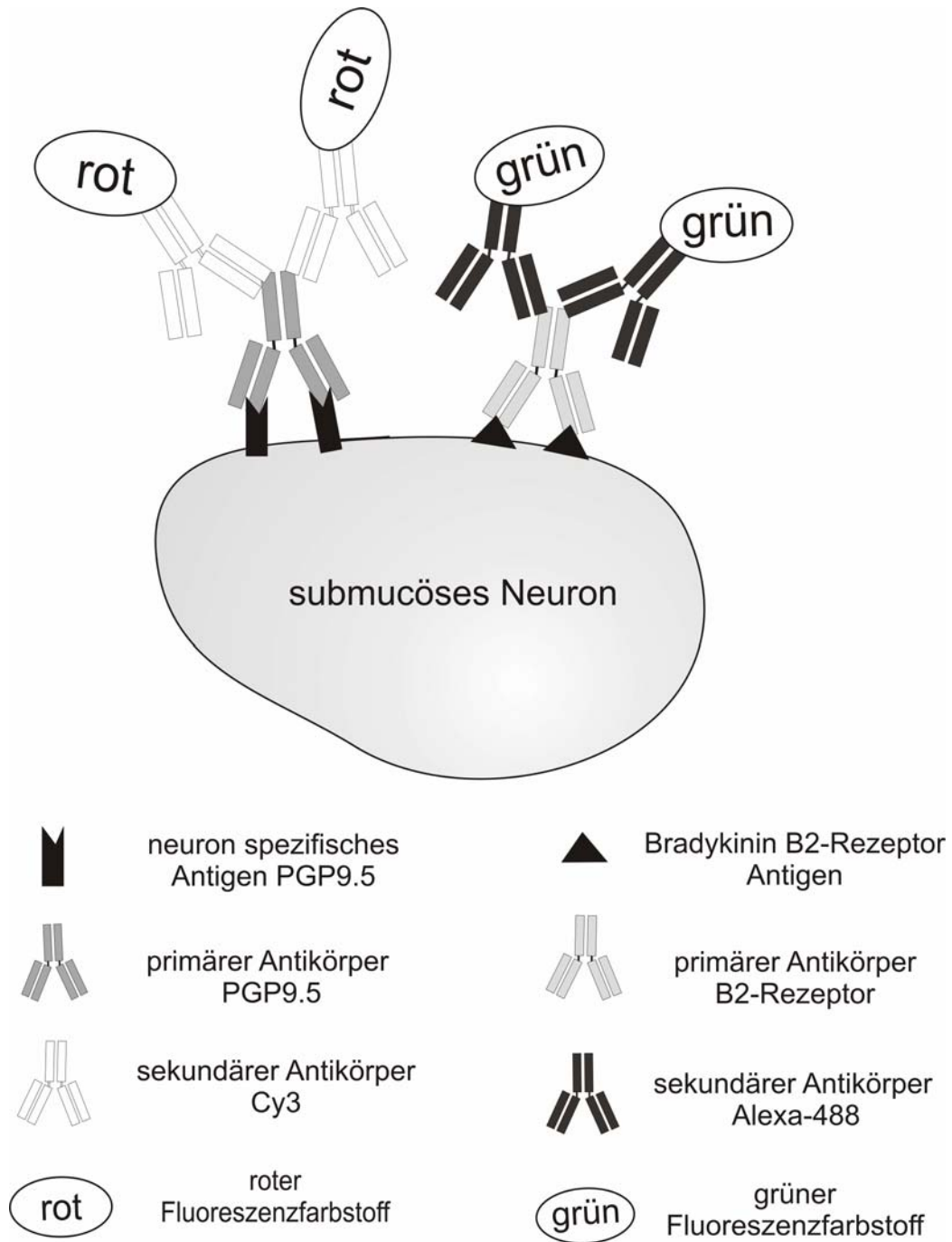


Abb. II-8: Prinzip der Doppelmarkierung mittels indirekter Immunfluoreszenz am Beispiel der Doppelmarkierung von Neuronen und dem Bradykinin B2-Rezeptor

Die primären Antikörper gegen das neuronspezifische PGP9.5 bzw. den Bradykinin B2-Rezeptor binden mit ihren Fab-Fragmenten an die Epitope des Antigens PGP9.5 bzw. des B2-Rezeptors. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 oder Alexa-488) gekoppelten Sekundärantikörper binden an das Fc-Fragment des jeweiligen primären Antikörpers. Dieser Komplex kann lichtmikroskopisch detektiert werden. Bei einer Doppel- oder Mehrfachmarkierung müssen die Primärantikörper aus verschiedenen Tierspezies stammen (hier aus Hase und Maus) und die Fluoreszenzfarbstoffe dürfen nicht vom gleichen Farbtyp sein (hier rot und grün).

9.2 Verwendete Antikörper

Die verwendeten Antikörper waren zum Teil polyklonalen und zum Teil monoklonalen Ursprungs. Polyklonale Antikörper werden aus dem Serum von immunisierten Tieren gewonnen. Es handelt sich also um ein Gemisch aus verschiedenen Antikörpern, die nach einer physiologischen Immunreaktion von verschiedenen B-Zellen produziert wurden. Zwar erkennen alle gebildeten Antikörper das gleiche gesuchte Protein, aber jeweils an unterschiedlichen Epitopen. Bedingt durch die Heterogenität der polyklonalen Antikörper kann die unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz erhöht sein. Monoklonale Antikörper dagegen werden nur von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehenden Zelllinie (Zellklon) produziert und richten sich daher alle gegen das gleiche Epitop. Monoklonale Antikörper erreichen dadurch eine größere Spezifität (Noll & Schaub-Kuhnen 2000).

Bei der Auswahl der verwendeten Antikörper musste darauf geachtet werden, dass der sekundäre Antikörper gegen das Immunglobulin der Tierart, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde, gerichtet ist. Das heißt, jeder sekundäre Antikörper kann mit jedem primären Antikörper kombiniert werden, solange die Tierart übereinstimmt (Larsson 1988). Bei Doppelmarkierungen musste zusätzlich beachtet werden, dass die sekundären Antikörper jeweils an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt waren. So konnte z.B. Alexa-488, das grün dargestellt wird, mit Cy3, das rot dargestellt wird, kombiniert werden, nicht jedoch Alexa-488 mit dem ebenfalls grün fluoreszierenden FITC. Bei einer Dreifachmarkierung konnten die beiden Sekundärantikörper mit dem blau erscheinenden Kernfarbstoff DAPI kombiniert werden. DAPI färbt Zellkerne unabhängig von der Zellart an und ermöglicht so eine bessere Orientierung im Gewebe (Kubista et al. 1987). Tabelle II-1 gibt Auskunft über die verwendeten primären Antikörper und Tabelle II-2 über die verwendeten sekundären Antikörper.

Tabelle II-1: Verwendete primäre Antikörper

Primärantikörper	Ziel- struktur	Wirt	Ver- dünnung	Inkubations- zeit	Hersteller
PGP9.5 (anti-protein gene product 9.5)	Neurone	Maus	1:1000	12 h	Millipore, Eschborn, Deutschland
GFAP (anti-glial fibrillary acidic protein)	Gliazellen	Maus	1:800	12 h	Millipore, Eschborn, Deutschland
GFAP (anti-glial fibrillary acidic protein)	Gliazellen	Kaninchen	1:1000	12 h	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-Bradykinin B1-Rezeptor	Bradykinin B1- Rezeptor	Ziege	1:50	40 h	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Anti-Bradykinin B2-Rezeptor	Bradykinin B2- Rezeptor	Maus	1:200	48 h	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Tabelle II-2: Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundärantikörper	Zielstruktur	Darstellung	Inkubationszeit	Verdünnung	Hersteller
Alexa-488-donkey anti-mouse IgG	Primärantikörper aus der Maus	grün	2 h	1:500	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FITC-donkey anti-goat IgG	Primärantikörper aus der Ziege	grün	2 h	1:500	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Cy3-goat anti-mouse IgG	Primärantikörper aus der Maus	rot	2 h	1:500	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy3-donkey anti-rabbit IgG	Primärantikörper aus dem Kaninchen	rot	2 h	1:800	Dianova, Hamburg, Deutschland

9.3 Durchgeführte Doppelmarkierungen

Neurone und Gliazellen innerhalb des intakten submucösen Häutchenpräparats sowie isolierte Neurone und Gliazellen aus der primären submucösen Zellkultur wurden jeweils einzeln durch eine Einfachmarkierung anhand bestimmter von ihnen exprimierter Proteine identifiziert. Bei Neuronen wurde das Genprodukt PGP9.5 und bei Gliazellen das saure gliale Faserprotein GFAP detektiert. Die Lokalisation der Bradykinin-Rezeptoren B1 und B2 wurde durch Doppelmarkierungen mit Neuronen oder Gliazellen untersucht. Tabelle II-3 listet die durchgeführten Doppelmarkierungen auf. Teilweise folgte den Doppelmarkierungen eine Kernfärbung mit DAPI.

Tabelle II-3: Durchgeführte Doppelmarkierungen

Durchgeführte Doppelmarkierungen		
Neurone	+	Gliazellen
Neurone	+	Bradykinin B1-Rezeptor
Neurone	+	Bradykinin B2-Rezeptor
Gliazellen	+	Bradykinin B2-Rezeptor

9.4 Immunhistochemische Markierung des intakten Plexus submucosus

Die Gewebestücke des intakten Häutchenpräparats des Plexus submucosus wurden für eine Stunde auf Eis in 4 % (Gew/Vol) Paraformaldehyd fixiert. Nach mehreren Waschschritten konnten die fixierten Gewebe bis zu zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bei der Versuchsplanung der Doppelmarkierungen war darauf zu achten, dass die unterschiedlichen Inkubationszeiten der Antikörper aufeinander abgestimmt waren. Durchgeführt wurden die immunhistochemischen Markierungen in Multi-Well-Zellkulturschälchen unter Lichtschutz bei Raumtemperatur in geschlossenen Kammern mit hoher Luftfeuchtigkeit. Tabelle II-4 zeigt ein exemplarisches Protokoll einer Doppelmarkierung mit anschließender DAPI-Kernfärbung. Einfachmarkierungen erfolgten nach dem gleichen Schema, wobei aber jeweils nur ein primärer und sekundärer Antikörper eingesetzt wurden.

Tabelle II-4: Exemplarisches Protokoll einer Doppelmarkierung innerhalb des intakten Häutchenpräparats des Plexus submucosus

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit
Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	0,5 % (Vol/Vol) Triton-X-100-haltige Blockierungslösung	2 h
Inkubation	Primärantikörper A + Primärantikörper B in 0,5 % (Vol/Vol) Triton-X-100-haltiger Blockierungslösung	jeweils variabel, siehe Tabelle II-1
Waschen	Phosphatpuffer	3 x 5 min
Inkubation	Sekundärantikörper A + Sekundärantikörper B in 0,5 % (Vol/Vol) Triton-X-100-haltiger Blockierungslösung	jeweils 2 h
Waschen	Phosphatpuffer	3 x 5 min
Kernfärbung	DAPI-Lösung	5 min
Waschen	Phosphatpuffer	3 x 5 min
Waschen	Aqua dest.	3 sek
Einbetten	1 Tropfen Citifluor	

Der erste Arbeitsschritt bei Immunfluoreszenz-Markierungen war das Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen durch eine 2-stündige Inkubation in Blockierungslösung. Erst danach wurde der Blockierungslösung der (oder die) primäre(n) Antikörper zugesetzt. Nach ausreichender Inkubationsdauer der primären Antikörper (siehe Tabelle II-1) folgten drei Waschschrte, denen sich die 2-stündige Inkubation mit dem (oder den) sekundären Antikörper(n) anschloss. Die verwendeten Verdünnungen der Antikörper sind den Tabllen II-1 und II-2 zu entnehmen.

Je nach Bedarf konnte nach erneutem Waschen eine Zellkernfärbung mit DAPI angeschlossen werden. Dieser Farbstoff interkaliert vornehmlich in AT-(Adenin und Thymin)-reiche Sequenzen der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix und lässt sich nach Anregung mit UV-Licht als cyanblaues Fluorophor in allen Zellkernen nachweisen (Tanious et al. 1992). Nach weiteren Waschschrten folgte ein kurzes Eintauchen der Glasplättchen in Aqua dest. um eine Kristallisation von Puffersalzen zu vermeiden. Anschließend wurden die Plättchen mit der Gewebeseite nach unten auf einen Objektträger gelegt, auf dem ein Tropfen Citifluor aufgebracht war.

9.5 Immuncytochemische Markierung der primären submucösen

Zellkultur

Die Zellen aus der primären submucösen Zellkultur wurden für 15 min auf Eis 4 % (Gew/Vol) in Paraformaldehyd fixiert. Nach der Fixierung und drei Waschschrten konnten die Zellplättchen bis zur Fluoreszenzmarkierung im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die durchgeführten Doppelmarkierungen entsprachen den in der Tabelle II-3 für das intakte Häutchenpräparat aufgelisteten Kombinationen. Die Durchführung der Einzel- oder Mehrfachmarkierungen unterschied sich nur in einem Punkt von dem in Tabelle II-4 angegebenen Protokoll für das intakte Gewebe. Da die kultivierten Zellen isoliert und dadurch stärker exponiert waren, wurde eine geringere Menge Triton-X-100 eingesetzt. Triton-X-100 ist ein ungeladenes, neutrales Detergens, das Proteine relativ schwach denaturiert und so dazu beiträgt, dass die Zielstruktur für den Antikörper besser zugänglich wird. Für die isolierten Zellen war bereits eine Blockierungslösung mit 0,05 % (Vol/Vol) Triton-X-100 ausreichend.

9.6 Mikroskopie

Die Analyse der markierten submucösen Zellen des intakten Gewebes und der primären Zellkultur erfolgte an einem Nikon Eclipse 80i Mikroskop. Das Mikroskop war mit speziellen Filtern ausgestattet, die nur bestimmte, für die Anregung des jeweiligen Sekundärantikörpers benötigte Wellenlängen passieren ließen. Die Cy3-konjugierten Antikörper wurden mit einer Wellenlänge von 510 - 530 nm angeregt, woraufhin eine Emission bei 630 - 660 nm stattfand. Die Alexa-488- und FITC-konjugierten Antikörper konnten durch Licht der Wellenlänge 450 - 490 nm angeregt werden. Die Emission erfolgte bei einer Wellenlänge von 510 - 530 nm. Zur Anregung des Kernfarbstoffs DAPI diente Licht der Wellenlänge 358 nm. Das emittierte Licht hatte eine Wellenlänge von 461 nm.

Die Bilddokumentation erfolgte über eine digitale Schwarz/Weiß-Kamera (S/W-Kamera Digital Slight DS 2 M BWc, Nikon, Deutschland). Mit Hilfe des Software-Programms NIS-Elements 2.30 (Nikon, Deutschland) wurden die Schwarz-Weiß-Bilder entsprechend der emittierten Lichtfarbe eingefärbt. So sind Cy3-Signale immer rot dargestellt, Alexa-488- und FITC-Signale immer grün und DAPI-Kernsignale blau. Die bis zu drei bei unterschiedlichen Wellenlängen fotografierten Einzelbilder des gleichen Ausschnitts konnten anschließend überlagert werden. Durch diese Überlagerung wurde untersucht, ob die gefärbten Proteine colokalisiert waren. Bei einer Colokalisation mischten sich die roten und grünen Signale der Sekundärantikörper zu einer gelben Farbe. Alle Bilder wurden qualitativ ausgewertet. Eine quantitative Bestimmung der Zellzahlen wurde nicht vorgenommen. Die mit dem Programm NIS-Elements dokumentierten Bilder wurden in dem Programm Adobe Photoshop weiterbearbeitet, um beispielsweise eine Bildtafel zu erstellen oder gegebenenfalls den Kontrast zu verstärken.

9.7 Negativkontrollen

Zu jeder durchgeführten Fluoreszenzmarkierung wurde eine Negativkontrolle angefertigt, bei der die Inkubation ohne den primären Antikörper erfolgte. Die Negativkontrolle diente dazu, unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers mit dem Gewebe auszuschließen. Das Auftreten von Fluoreszenzsignalen in den Negativkontrollen hätte auf unspezifische Bindungen hingewiesen. In einem solchen Fall, der während der vorliegenden Arbeit nicht

auftrat, hätte diese Versuchsreihe nicht ausgewertet werden dürfen, da die erhaltenen Fluoreszenzsignale nicht spezifisch für das gesuchte Antigen gewesen wären.

10 Ussingkammer-Messungen

10.1 Theorie der Ussingkammer-Technik

Die Ussingkammer-Technik wurde Anfang der fünfziger Jahre von Hans Ussing entwickelt und später modifiziert (Ussing & Zerahn 1951). Sie ermöglicht eine elektrische Messung an isoliertem Gewebe wie beispielsweise des in dieser Arbeit verwendeten Submucosa-Mucosa-Präparats aus dem Colon.

Um Ionenbewegungen über das zu untersuchende Gewebe messen zu können, wird auf beide Seiten der Messkammer ein gleiches Volumen (hier: 3,5 ml) mit gleicher Füllhöhe derselben Flüssigkeit gegeben. Dadurch wird die Triebkraft des hydrostatischen Drucks und des chemischen Gradienten aufgehoben. Übrig bleibt nur ein elektrischer Gradient, der durch spontane Ionenbewegungen gebildet wird. Das Darmgewebe der Ratte hat die Eigenschaft, spontan Cl^- -Ionen zu sezernieren (Strabel & Diener 1995), wodurch es zu einer transepithelialen Potentialdifferenz kommt. Das heißt, die serosale Seite, auch basolaterale Seite oder Blutseite genannt, wird gegenüber der mucosalen (apikalen) Seite, die im Organismus zum Darmlumen orientiert ist, um einige mV positiver. Gemessen wird diese Potentialdifferenz von gewebe-nah angebrachten Elektroden (1 mm Abstand). Die Messung in diesem Modus wird Open-Circuit genannt.

Zudem ist die Ussingkammer an ein zweites Elektrodenpaar angeschlossen, das weiter entfernt vom Gewebe liegt und die Applikation eines definierten Stroms, des sogenannten Kurzschlussstroms (I_{sc}), ermöglicht. Beide Elektrodenpaare werden über Agarbrücken (5 % (Gew/Vol) Agar in Parsons-Lösung) mit der Messkammer verbunden. Der erwähnte Kurzschlussstrom entspricht in seiner Größe den gemessenen epithelialen Netto-Ionenbewegung, ist diesen jedoch entgegengerichtet. Durch diese kompensatorische Wirkung wird die zuvor gemessene Potentialdifferenz ausgeglichen und damit auf 0 mV geklemmt. In

diesem Voltage-Clamp-Modus ist die elektrische Triebkraft für passive Ionenbewegungen ausgeschaltet. Es können so nur noch Ströme gemessen werden, die auf aktiven Bewegungen beruhen. Der Kurzschlussstrom ist per Definition dann positiv, wenn es zu einer Anionensekretion kommt, also zu einer Bewegung von negativ geladenen Ionen von serosal nach mucosal.

10.2 Messkammer

Abbildung II-9 zeigt eine schematisch gezeichnete Ussingkammer. Die Messkammer, bestehend aus zwei miteinander verschraubbaren Plexiglashälften, ist an einen Wasserkreislauf angeschlossen, der eine Temperierung der Lösung innerhalb der Ussingkammer auf 37° C ermöglichte. Die sich in der jeweiligen Kammerhälfte befindliche Pufferlösung konnte über eine Öffnung in der Kammer gewechselt werden, ebenso ließen sich über diese Öffnung verschiedene Substanzen applizieren. Über zwei Gasfritten am Kammerboden konnten Gewebe und Pufferlösung kontrolliert begast werden, was eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und eine Konstanzhaltung des pH-Werts gewährleistete. Unter diesen Bedingungen blieben die epithelialen Funktionen bis zu sechs Stunden nach Organentnahme erhalten ohne morphologische Veränderungen aufzuweisen. Das Gewebepräparat wurde zwischen den beiden Kammerhälften mit Hilfe von mehreren Metallstiften eingespannt, wodurch zwei separate, nur von dem Gewebe getrennte Kompartimente entstanden. So war es möglich, Substanzen während des Versuchs nur in eine der beiden Kammerhälften und damit nur auf eine Gewebeseite zu applizieren. Zur rechten Hälfte der Kammer orientiert befand sich die mucosale Gewebeseite und zur linken Hälfte orientiert die serosale Seite. Um an den Kontaktstellen zwischen den Kammerhälften einen wasserdichten Verschluss zu erhalten, wurde ein dünner Silikonfilm aufgetragen.

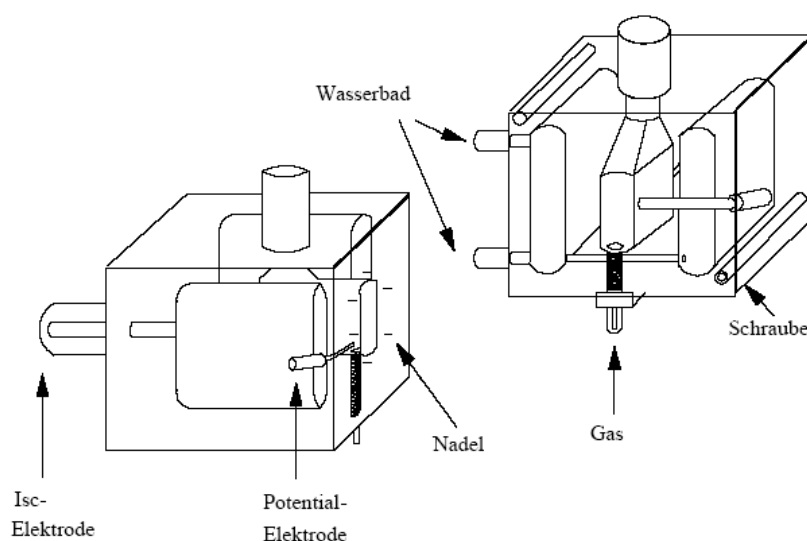


Abb. II-9: Schematische Darstellung einer Ussingkammer

10.3 Versuchsdurchführung und Datenerfassung

Während einer einstündigen Äquilibrationsphase stellte sich der Kurzschlussstrom auf ein stabiles Plateau ein. Danach konnte mit der Zugabe der zu untersuchenden Substanz begonnen werden. Elektrische Parameter wie Potentialdifferenz, Kurzschlussstrom oder Gewebeleitfähigkeit wurden mit Hilfe einer computergestützten automatischen Voltage-Clamp-Anlage (Aachen Microclamp, AC Copy Datentechnik, Aachen, Deutschland) kontinuierlich erfasst und gespeichert. Um die Gewebeleitfähigkeit (G_t) zu messen, wurde jede Minute ein bipolarer Strompuls von $\pm 50 \mu\text{A}$ für eine Dauer von 200 ms an das Gewebe angelegt. Aus der resultierenden Änderung der Potentialdifferenz konnte die Gewebeleitfähigkeit mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes ($R = U/I$) errechnet werden. Der Kurzschlussstrom wurde in $\mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ (mit $1 \mu\text{Eq}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2} = 26,9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) als Ladungsverschiebung eines monovalenten Ions pro Zeit und Gewebefläche angegeben. Zu Beginn jeder Messung wurde die Potentialdifferenz zwischen den einzelnen Elektroden und der Widerstand der verwendeten Lösungen bestimmt und von den Messdaten abgezogen.

11 Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Mittelwerten \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM) oder in Originalkurven. Wurden die Ergebnisse in Form von Messbalken abgebildet, stellt die Höhe der Säule den Mittelwert dar, der Fehlerbalken den SEM. Bei den Ca^{2+} -Imaging und Patch-Clamp-Messungen bezeichnet n die Anzahl der einzelnen gemessenen Neurone. Bei Ussingkammer- und Immunofluoreszenz-Messungen steht n für die Anzahl der verwendeten Tiere. Unabhängig davon wurden die Zellen oder Gewebe für alle Versuche jeweils aus mindestens zwei verschiedenen Tieren gewonnen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde entweder ein Student's t-Test oder ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein F-Test legte fest, welche dieser beiden Methoden angewendet wurde. Um mehrere verschiedene Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde eine ANOVA (Analysis of variances) mit einem anschließenden Post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt. Erwiesen sich Gruppen als statistisch homogen, so wurden diese in den Abbildungen mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet. Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde berechnet, ob sich die Anzahl der auf Bradykinin reagierenden Neurone aus zwei verschiedenen Gruppen signifikant unterschied. Die Berechnungen erfolgten mit der Statistik Software Graph Pad Prism 5.0.

III Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt des Entzündungsmediators Bradykinin auf Nervenzellen des Plexus submucosus aus dem Colon der Ratte untersucht. Die submucösen Ganglienzellen wurden basal charakterisiert und weiterführend wurde der Einfluss von Bradykinin auf die mucosale Cl⁻-Sekretion ermittelt. Von besonderem Interesse bei dieser Arbeit war die Untersuchung des intrazellulären Mechanismus der Bradykinin-Wirkung. Die Versuche wurden an Neuronen des intakten Häutchenpräparats des Plexus submucosus, an isolierten, primär kultivierten submucösen Neuronen und an Submucosa-Mucosa-Präparaten mit intaktem Plexus submucosus durchgeführt. Ein Teil der Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit ist veröffentlicht (Avenary & Diener 2010a, Avenary & Diener 2010b).

1 Basale Charakterisierung der Neurone des intakten Plexus submucosus aus dem Colon der Ratte

1.1 Immunhistochemische Identifizierung der submucösen Zelltypen

Durch immunhistochemische Markierungen von zelltypspezifischen Proteinen sollten innerhalb des intakten Plexus submucosus Neurone und Gliazellen identifiziert werden. Nervenzellen lassen sich durch Markierung des neuronspezifischen Genprodukts PGP9.5 (protein gene product 9.5) nachweisen (Thompson et al. 1983). Gliazellen wurden mit dem Marker für das gliale saure Faserprotein (glial fibrillary acidic protein), GFAP abgekürzt, detektiert (Krammer & Kühnel 1992).

Die Markierung von PGP9.5 ergab, dass submucöse Neurone in Ganglien angeordnet sind, die untereinander durch lange dünne Faserstränge verbunden sind (Abbildung III-1A und B). Mit GFAP wurden Gliazellen detektiert. Diese schienen die Neurone und deren Ausläufer zu umschließen (Abb. III-1C). Mit Doppelfärbungen von Neuronen und Gliazellen bestätigte sich, dass die Neurone und - weniger stark ausgeprägt - auch deren Faserstränge von Gliazellen umhüllt sind (Abb. III-2).

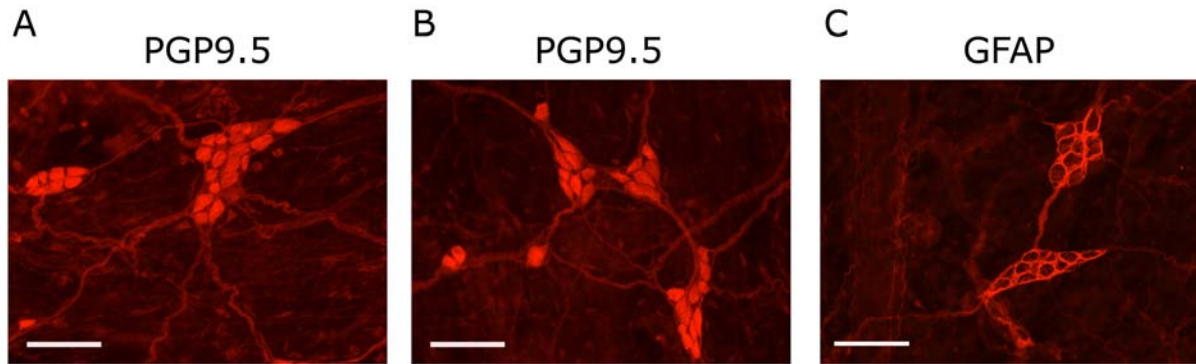


Abb. III-1: Immunhistochemische Markierung von Neuronen bzw. Gliazellen des intakten Plexus submucosus

A und B: Die submucösen Neurone sind in Ganglien angeordnet und durch Nervenfaserstränge miteinander verbunden. Sie sind mit PGP9.5 rot markiert **C:** Die submucösen Gliazellen sind mit GFAP rot markiert. Sie scheinen die Neurone und ihre Faserstränge zu umschließen. Eichbalken = 100 μm

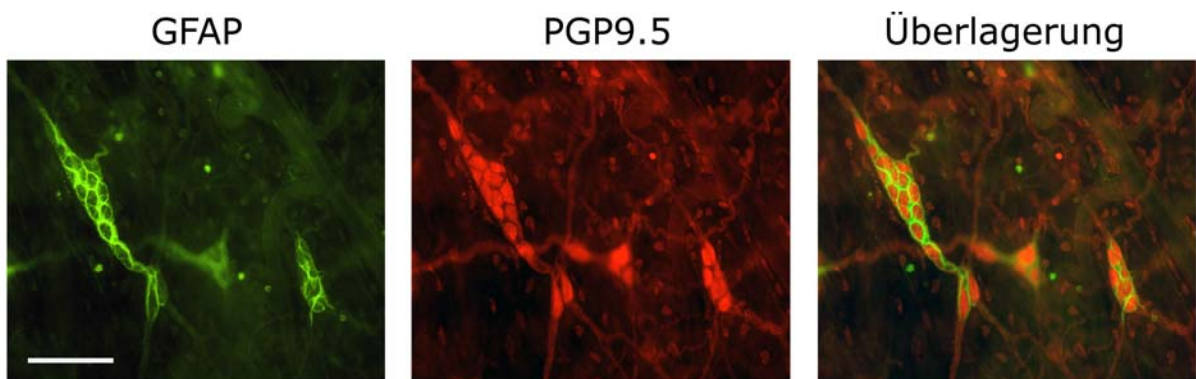


Abb. III-2: Immunhistochemische Doppelmarkierung von Neuronen und Gliazellen des intakten Plexus submucosus

Links: Submucöse Gliazellen sind mit GFAP grün markiert. **Mitte:** Die submucösen Neurone sind mit PGP9.5 rot markiert. **Rechts:** Die Überlagerung der beiden vorherigen Bilder lässt erkennen, dass Gliazellen (grün) zwischen den einzelnen Neuronen (rot) lokalisiert sind und diese umschließen. Eichbalken = 100 μm

1.2 Untersuchung der Wirkung von Carbachol auf Neurone des intakten Plexus submucosus

Da der stabile cholinerge Agonist Carbachol in Ca^{2+} -Imaging und Patch-Clamp-Experimenten als Vitalitätskontrolle verwendet werden sollte, wurde dessen Wirkungsweise auf submucöse Neurone mit Hilfe der Ca^{2+} -Imaging-Technik untersucht. Dazu wurden die Zellen mit normaler Tyrodelösung superfundiert, bis sich eine stabile Grundlinie des Fura-2-Signals einstellte. Zunächst wurden der Superfusion $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Carbachol und nach dem Auswaschen mit Tyrodelösung $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Carbachol zugesetzt. In Gegenwart von $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Carbachol reagierten 75 % der Zellen mit einem Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals, also mit einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration um $0,18 \pm 0,011$. Die Superfusion von $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Carbachol erzeugte in allen der 112 gemessenen Zellen einen Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals um $0,24 \pm 0,014$.

Antagonistenversuche wurden durchgeführt, um die an der Carbachol-Wirkung beteiligten Rezeptoren zu identifizieren. Hierbei diente Hexamethonium als N-Rezeptor-Antagonist und Atropin als M-Rezeptor-Antagonist. Während der Inhibierung des N-Rezeptors durch Hexamethonium ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) war der Anteil der auf Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) reagierenden Neurone auf 67 % reduziert ($n = 98$). Durch zusätzliche Hemmung des M-Rezeptors durch Atropin ($5 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) wurde der Anteil an reagierenden Neuronen weiter verringert und betrug nun 19 % in Gegenwart beider Antagonisten ($n = 58$). Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von Carbachol an submucösen Neuronen der Ratte sowohl durch ionotrope nicotinerge Rezeptoren (N-Rezeptoren) als auch durch metabotrope muskarinerge Rezeptoren (M-Rezeptoren) vermittelt wird. Die Fähigkeit von Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), die submucösen Neurone über zwei verschiedene Wege zu 100 % zu aktivieren, macht dieses Acetylcholin-Derivat zu einer sehr guten Vitalitätskontrolle.

1.3 Untersuchung der Bradykinin-Wirkung auf Neurone des intakten Plexus submucosus

In Ca^{2+} -Imaging-Experimenten wurde der Effekt von Bradykinin auf submucöse Neurone innerhalb des intakten Plexus submucosus untersucht. Zu Beginn der Messungen erfolgte eine Superfusion mit Tyrodelösung, bis sich eine stabile Grundlinie des Fura-2-Signals einstellte. Anschließend wurde das submucöse Gewebe mit einer Bradykinin-enthaltenden Tyrode superfundiert.

Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) erzeugte in über 80 % der Neurone einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration (Abbildung III-4), der nach durchschnittlich $54 \pm 9 \text{ s}$ sein Maximum erreichte und nach $94 \pm 14 \text{ s}$ (gemessen ab dem Peak) bis auf 50 % der Maximalantwort abgesunken war ($n = 8$). Um eine Konzentrations-Wirkungskurve zu erhalten, wurden der Superfusionslösung verschiedene Konzentrationen ($2 \cdot 10^{-10} - 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) an Bradykinin zugesetzt. Bereits die niedrigste getestete Konzentration ($2 \cdot 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) erzeugte einen Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} in 45 % der Neurone. Durch Erhöhen der Kinin-Konzentration vergrößerte sich sowohl der prozentuale Anteil der Zellen, die auf Bradykinin reagierten, als auch die Amplitude des Ca^{2+} -Anstiegs in konzentrationsabhängiger Art und Weise (Abb. III-5A, B). Weil der prozentuale Anteil reagierender Neurone bei der Konzentration $2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Bradykinin am größten war und zudem bei dieser Konzentration noch kein Effekt auf die zum Teil im Präparat vorhandene glatte Muskulatur auftrat, wurde diese Konzentration für alle weiteren Ca^{2+} -Imaging-Experimente verwendet. Bei Konzentrationen ab $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Bradykinin konnte es zu einer kontraktionsauslösenden Wirkung auf Muskelzellen kommen, die eine Bewegung des Häutchenpräparats zur Folge hatte.

Eine zweite Applikation von Bradykinin zu den gleichen Zellen erzeugte einen Ca^{2+} -Anstieg reduzierter Amplitude. Dies spricht für eine Desensibilisierung der Bradykinin-Rezeptoren. Deshalb erfolgte in allen Experimenten nur eine einmalige Zugabe von Bradykinin.

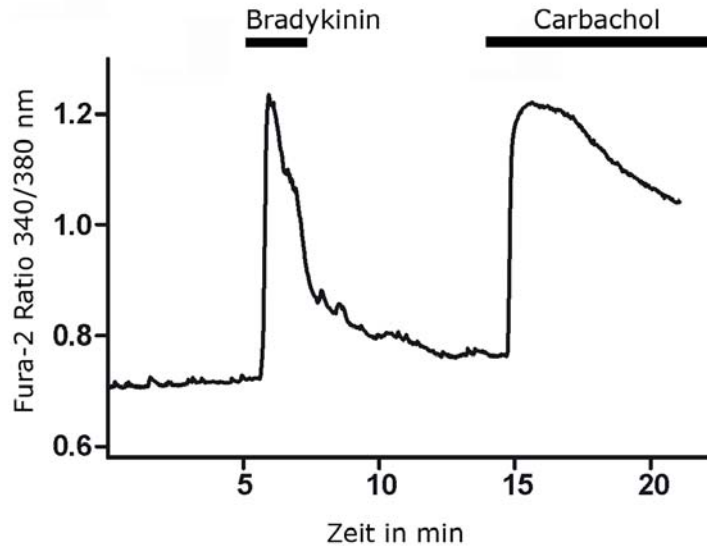


Abb. III-4: Repräsentative Kurve des Fura-2 Ratio-Signals

Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; linker Balken) erzeugte in submucösen Neuronen des Colons einen Anstieg des Fura-2 Ratio-Signals. Dieses entspricht dem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechter Balken) diente als Vitalitätskontrolle. Eine Bradykinin-Antwort wurde als solche akzeptiert, wenn gleichzeitig zwei Bedingungen erfüllt waren: 1. Die Amplitude des Ca^{2+} -Anstiegs musste die vierfache Standardabweichung der Schwankung der Grundlinie vor Zugabe von Bradykinin überschreiten. 2. Die Amplitude des Fura-2-Ratio-Anstiegs musste einen absoluten Wert von 0,1 überschreiten.

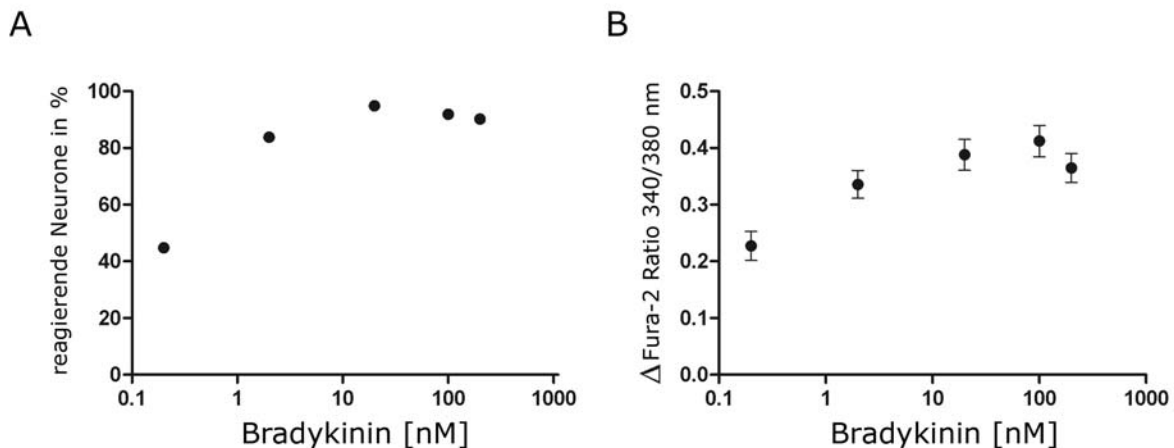


Abb. III-5: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Bradykinin

A: Bradykinin erzeugte einen konzentrationsabhängigen Anstieg des prozentualen Anteils der auf Bradykinin reagierenden Neurone. **B:** Die Amplitude des Bradykinin-erzeugten cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs in den reagierenden Neuronen vergrößerte sich konzentrationsabhängig. Die Werte der Amplituden stellen Mittelwerte dar; die vertikalen Linien den jeweiligen Standardfehler SEM; $n = 29 - 41$.

1.4 Identifizierung der beteiligten Bradykinin-Rezeptoren

1.4.1 Identifizierung der Bradykinin-Rezeptoren durch Agonisten- und Antagonisten-Versuche

Um herauszufinden, welcher Bradykinin-Rezeptor-Subtyp den in III-1.3 beobachteten Bradykinin-induzierten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vermittelt, wurden Experimente mit spezifischen Bradykinin B1- und B2-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten durchgeführt. Für eine Übersicht der verwendeten Substanzen siehe Hess et al. 1992, Arai et al. 1999 und Hu et al. 2004a.

Eine Inhibition des Bradykinin B1-Rezeptors mit dem Antagonisten [des-Arg¹⁰]-HOE 140 ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) beeinflusste die Wirkung von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nicht. Weder der prozentuale Anteil der reagierenden Neurone noch die Amplitude des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs waren verändert (Abb. III-6A; Tabelle III-1). Auch der Bradykinin B1-Rezeptor-Agonist Bradykinin-Fragment 1-8 ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) konnte den Effekt von Bradykinin nicht imitieren, nur in 4 % der Neurone wurde ein geringer Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration beobachtet (Abb. III-6B; Tabelle III-2).

Sogar sechs Stunden nach der Isolation des Plexus submucosus konnte der B1-Rezeptor-Agonist keinen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration hervorrufen. Die Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung des Bradykinin B1-Rezeptors bei der Bradykinin-induzierten Aktivierung submucöser Neurone und gegen eine Induzierbarkeit dieses Rezeptors. Am Epithel des Colons hingegen konnte gezeigt werden, dass der Bradykinin B1-Rezeptor sechs Stunden nach der Gewebeiisolation induziert werden konnte (Teather & Cuthbert 1997).

Der Bradykinin B2-Rezeptor-Antagonist HOE 140 ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) unterdrückte den Bradykinin-induzierten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration komplett (Abb. III-7). Kein einziges der 38 gemessenen Nervenzellen reagierte in Gegenwart von HOE 140 auf Bradykinin (Abb. III-8A; Tabelle III-1). Der Bradykinin B2-Rezeptor-Agonist [Hyp³]-Bradykinin ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) war in der Lage, die Wirkung von Bradykinin nachzuahmen. Sowohl der prozentuale Anteil reagierender Neurone als auch die Amplitude des Ca^{2+} -Anstiegs entsprachen der Bradykinin-Antwort (Abb. III-8B; Tabelle III-2). Diese Ergebnisse zeigen, dass der durch Bradykinin ausgelöste Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in

submucösen Neuronen der Ratte ausschließlich durch Bradykinin B2-Rezeptoren vermittelt wird, während eine Beteiligung von Bradykinin B1-Rezeptoren auszuschließen ist.

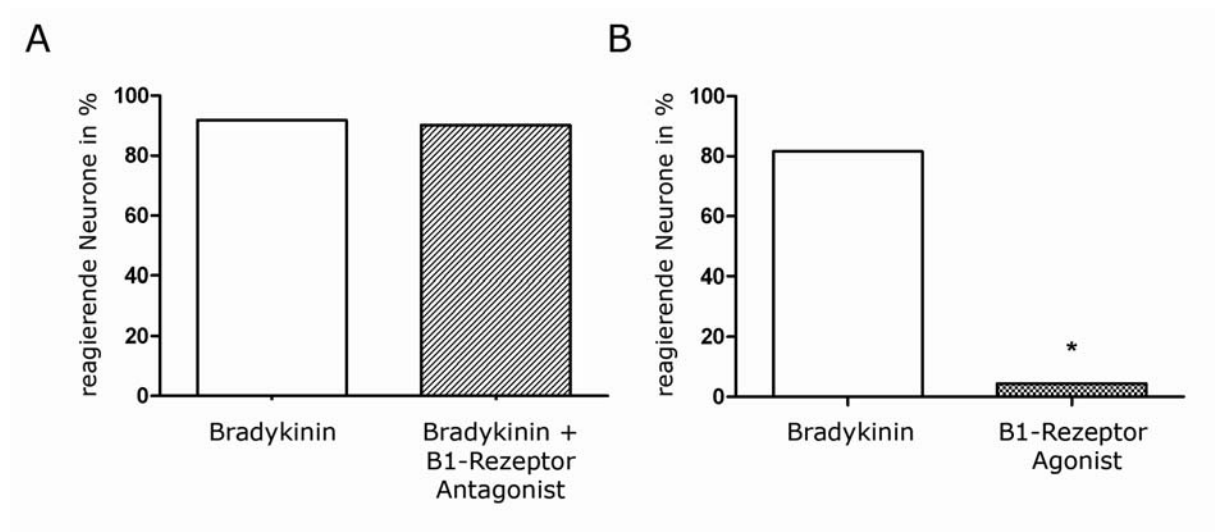


Abb. III-6: Bradykinin B1-Rezeptor-Antagonisten bzw. Agonisten-Versuche

A: Der linke Balken zeigt den prozentualen Anteil der Neurone, die auf Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) mit einer Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reagierten. In Gegenwart des B1-Rezeptor-Antagonisten [des-Arg¹⁰]-HOE 140 ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechter Balken) war dieser Anteil unverändert; $n = 49 - 51$. **B:** Der weiße Balken zeigt den Anteil der auf Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) reagierenden Neurone. Der B1-Rezeptor-Agonist Bradykinin-Fragment 1-8 ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, rechter Balken) erzeugte nur in zwei Neuronen eine Antwort; $n = 44 - 60$. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin ohne Antagonist.

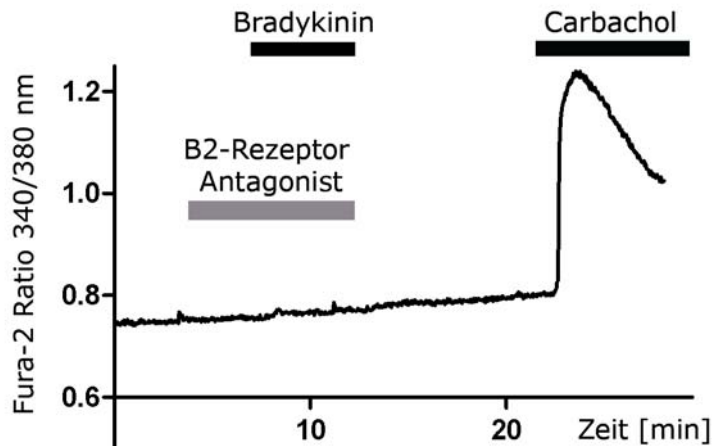


Abb. III-7: Repräsentative Kurve der durch den B2-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 unterdrückten Bradykinin-Antwort

Der Bradykinin B2-Rezeptor-Antagonist HOE 140 ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; grauer Balken) inhibiert den Bradykinin-induzierten Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration komplett (Bradykinin $2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; schwarzer linker Balken). Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechter Balken) diente als Vitalitätskontrolle.

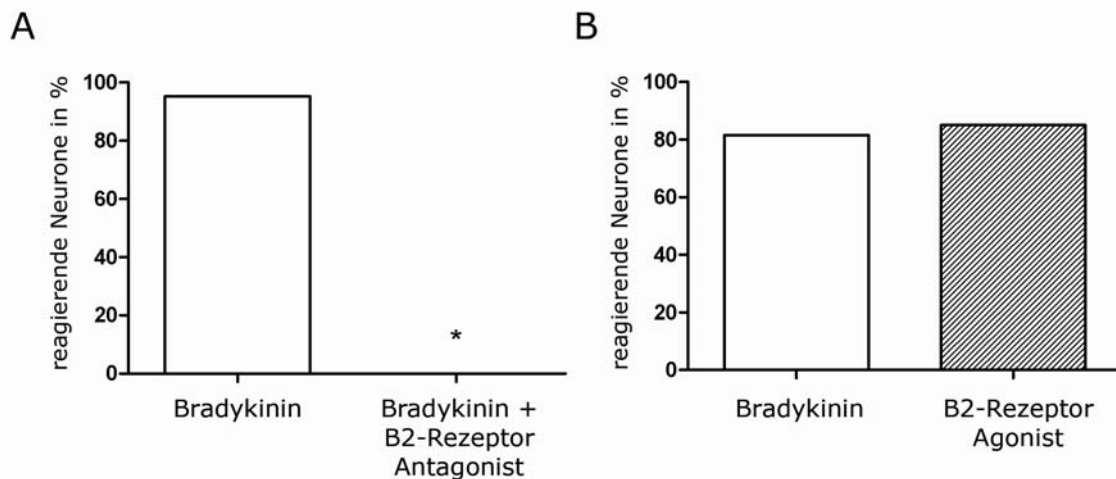


Abb. III-8: Bradykinin B2-Rezeptor-Antagonisten bzw. Agonisten-Versuche

A: Der linke Balken zeigt den Anteil der auf Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) reagierenden Neurone. Der Effekt von Bradykinin wird in Gegenwart des Bradykinin B2-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) vollständig inhibiert (rechts); $n = 38 - 63$. **B:** Der Bradykinin B2-Rezeptor-Agonist [Hyp^3]-Bradykinin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechter Balken) imitierte die Bradykinin-Antwort; $n = 50 - 60$. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin ohne Antagonist.

Tabelle III-1: Effekt von Bradykinin in Gegenwart und Abwesenheit von Bradykinin B1- bzw. B2-Rezeptor-Blocker

Bradykinin ±	Anteil reagierender Neurone (%)		Amplitude des Fura-2 Ratio-Anstiegs der reagierenden Neurone		n
	- Antagonist	+ Antagonist	- Antagonist	+ Antagonist	
[des-Arg ¹⁰]-HOE 140 (Bradykinin B1-Rezeptor-Blocker)	92	90	0,35 ± 0,019	0,34 ± 0,025	49 - 51
HOE 140 (Bradykinin B2-Rezeptor-Blocker)	95	0*	0,35 ± 0,017	-	38 - 63

Effekt von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Abwesenheit (- Antagonist) und Gegenwart (+ Antagonist) des Bradykinin B1-Rezeptor-Antagonisten [des-Arg¹⁰]-HOE 140 ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und des Bradykinin B2-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Werte der Amplituden sind als Mittelwerte ± SEM angegeben; * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin ohne Antagonist.

Tabelle III-2: Effekt von Bradykinin allein im Vergleich zum Effekt von Agonisten des Bradykinin B1- bzw. B2-Rezeptors

Anteil reagierender Neurone (%)		Amplitude des Fura-2 Ratio-Anstiegs der reagierenden Neurone		
Bradykinin	Bradykinin-Fragment 1-8 (Bradykinin B1-Rezeptor-Agonist)	Bradykinin	Bradykinin-Fragment 1-8 (Bradykinin B1-Rezeptor-Agonist)	n
82	4*	$0,32 \pm 0,021$	$0,17 \pm 0,021^a$	44 - 60
Bradykinin	[Hyp ³]-Bradykinin (Bradykinin B2-Rezeptor-Agonist)	Bradykinin	[Hyp ³]-Bradykinin (Bradykinin B2-Rezeptor-Agonist)	n
82	85	$0,32 \pm 0,021$	$0,29 \pm 0,031$	40 - 60

Effekt von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) allein im Vergleich zum Effekt des Bradykinin B1-Rezeptor-Agonisten Bradykinin-Fragment 1-8 ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und des B2-Rezeptor-Agonisten [Hyp³]-Bradykinin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Werte der Amplituden sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin. ^a Ein statistischer Vergleich war nicht möglich, da nur zwei Neurone auf diesen Agonisten reagiert haben.

1.4.2 Identifizierung der Bradykinin-Rezeptoren durch immunhistochemische Markierungen

Durch immunhistochemische Markierungen sollte untersucht werden, ob Neurone des intakten Häutchenpräparats des Plexus submucosus Bradykinin B1- und/oder Bradykinin B2-Rezeptoren besitzen. Bei der gleichzeitigen Markierung von Neuronen und dem Bradykinin B2-Rezeptor war sowohl für Neurone als auch für B2-Rezeptoren ein deutliches Signal zu erkennen (Abb. III-9 untere Reihe). Der Bradykinin B2-Rezeptor konnte in allen submucösen Nervenzellen beobachtet werden. Eine Doppelmarkierung von Neuronen und Bradykinin B1-Rezeptoren ergab eine deutliche Anfärbung der Nervenzellen, allerdings war für den B1-Rezeptor kein Signal zu erkennen (Abb. III-10).

Die Färbungen sprechen dafür, dass Bradykinin B1-Rezeptoren in submucösen Neuronen fehlen und dass der Bradykinin-Effekt im intakten Plexus submucosus allein durch Bradykinin B2-Rezeptoren vermittelt wird. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten aus den Ca^{2+} -Imaging-Experimenten überein (siehe III-1.4.1).

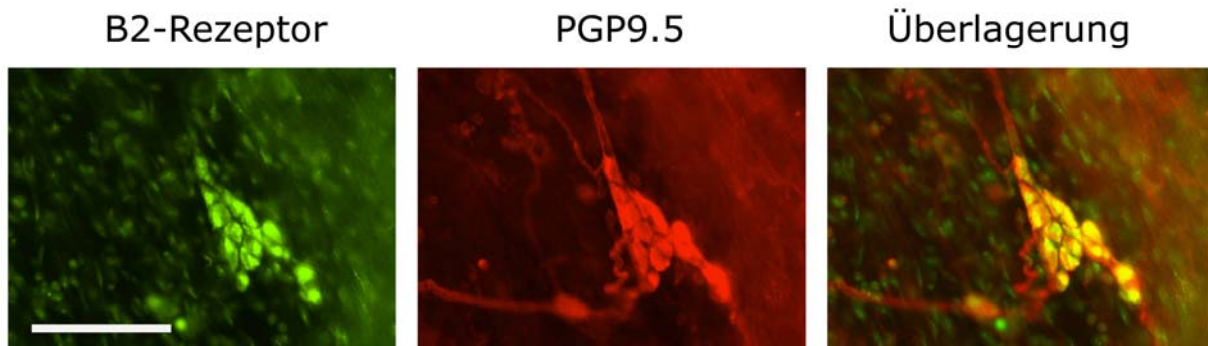


Abb. III-9: Immunhistochemische Markierung des Bradykinin B2-Rezeptors in Neuronen des intakten Plexus submucosus

Doppelmarkierung von Bradykinin B2-Rezeptoren und Neuronen. **Links:** Der Bradykinin B2-Rezeptor ist gut sichtbar (grün). **Mitte:** Die Neurone sind mit PGP9.5 rot dargestellt. **Rechts:** Eine Überlagerung der beiden vorherigen Bilder lässt eine deutliche Gelbfärbung erkennbar werden. Das gelbe Signal entsteht durch eine Colokalisation der grün fluoreszierenden Signale der Bradykinin B2-Rezeptoren mit den rot fluoreszierenden Signalen der Neurone. Eichbalken = 100 μm

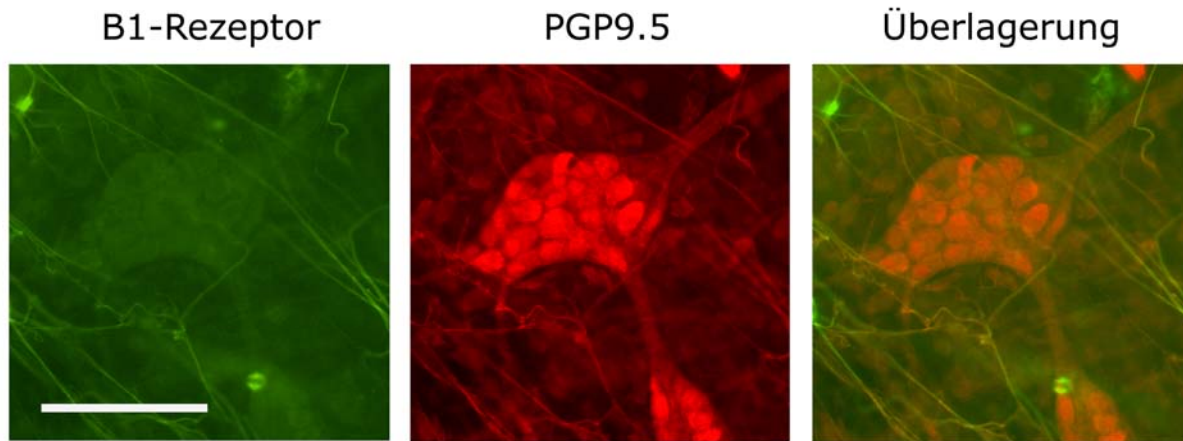


Abb. III-10: Immunhistochemische Markierung des Bradykinin B1-Rezeptors in Neuronen des intakten Plexus submucosus

Doppelmarkierung von Bradykinin B1-Rezeptoren und Neuronen. **Links:** Außer einer unspezifischen Hintergrundfärbung (grün) ist kein Signal des Bradykinin B1-Rezeptors zu erkennen. **Mitte:** Die Neurone sind mit PGP9.5 rot dargestellt. **Rechts:** Eine Überlagerung der ersten beiden Bilder, bei der keine gelbe Färbung erkennbar ist, die aus einer Colokalisation des Bradykinin B1-Rezeptors mit Neuronen entstehen würde. Eichbalken = 100 μm

Aus Studien am myenterischen Plexus war bekannt, dass Bradykinin eine Wirkung auf Gliazellen hat. Bradykinin löst dort eine Ausschüttung von Prostaglandinen aus, die daraufhin sekundär Neurone aktivieren (Murakami et al. 2007). Um herauszufinden, ob submucöse Gliazellen ebenfalls den Bradykinin B2-Rezeptor besitzen und deshalb in der Lage sind auf Bradykinin zu reagieren, wurde eine Doppelmarkierung von Gliazellen und Bradykinin B2-Rezeptoren durchgeführt. Die Färbung zeigte kein Bradykinin B2-Rezeptor-Signal auf den glialen Zellen des intakten Plexus submucosus (Abb. III-11). Dieses Ergebnis spricht gegen eine Beteiligung von Gliazellen bei der Wirkung von Bradykinin in diesem Teil des enterischen Nervensystems.

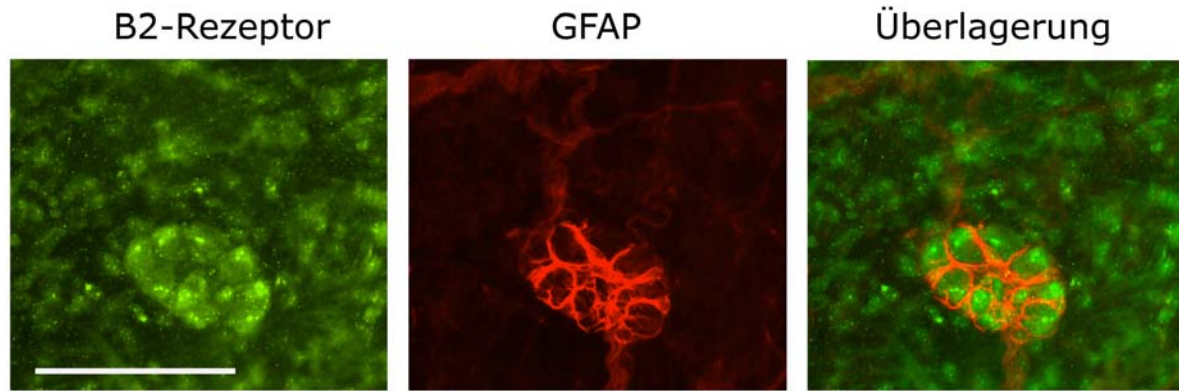


Abb. III-11: Immunhistochemische Doppelmarkierung von Bradykinin B2-Rezeptoren und Gliazellen des intakten Plexus submucosus

Doppelmarkierung von Bradykinin B2-Rezeptoren und Gliazellen. **Links:** Der Bradykinin B2-Rezeptor ist grün dargestellt. **Mitte:** Gliazellen sind mit GFAP rot markiert. **Rechts:** Die Überlagerung der beiden vorherigen Bilder zeigt kein gelbes Signal, also keine Colokalisation der beiden angefärbten Strukturen. Eichbalken = 100 µm

2 Beteiligung von Cyclooxygenase-Metaboliten am Bradykinin-Effekt

Bradykinin kann in verschiedenen Zelltypen wie Neuronen und Epithelzellen die Bildung von Prostaglandinen induzieren. Es wird vermutet, dass in diesen Zellen die eigentliche Wirkung von Bradykinin erst sekundär durch die freigesetzten Prostaglandine vermittelt wird (Diener et al. 1988a, Murakami et al. 2007). Prostaglandine spielen unter anderem bei Entzündungen eine Rolle und werden durch die Enzyme Cyclooxygenase I und II synthetisiert. Dies hat zur Folge, dass der Bradykinin-Effekt häufig durch Blockade der Cyclooxygenasen hemmbar ist. Um zu testen, ob ein direkter Effekt von Bradykinin auf submucöse Neurone des Rattencolons vorliegt oder ob Prostaglandine den Effekt sekundär vermitteln, wurden die Prostaglandin-synthetisierenden Enzyme durch Indomethacin inhibiert und die Bradykinin-Wirkung gemessen.

2.1 Einfluss von Prostaglandinen auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration von submucösen Neuronen

Frühere Studien der Arbeitsgruppe an Submucosa-Mucosa-Präparaten aus dem Rattencolon, bestehend aus der Mucosa und dem Plexus submucosus, beschreiben, dass der Effekt von Bradykinin auf die mucosale Cl^- -Sekretion während einer Blockade der Prostaglandinsynthese durch Indomethacin gehemmt wird (Diener et al. 1988a). Mittels des Neurotoxins Tetrodotoxin wurde weiterhin gezeigt, dass die Bradykinin-induzierte Cl^- -Sekretion neuronal, also über den Plexus submucosus vermittelt sein muss. Aufgrund dieser Daten war eine Beteiligung von Prostaglandinen bei der Bradykinin-Wirkung am intakten Plexus submucosus zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration submucöser Neurone mit Hilfe von Ca^{2+} -Imaging-Experimenten am intakten Plexus submucosus untersucht. In Gegenwart des Cyclooxygenase-Blockers Indomethacin ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) war die Bradykinin-Wirkung unverändert. Weder der Anteil an reagierenden Neuronen (Abb. III-12A) noch die Amplitude des Fura-2-Signals (Abb. III-12 B) wurde durch Hemmung der Cyclooxygenasen beeinflusst (Tabelle III-3). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der aufgrund der oben genannten früheren Daten der Arbeitsgruppe entwickelten Hypothese einer Prostaglandin-vermittelten neuronalen Bradykinin-Wirkung.

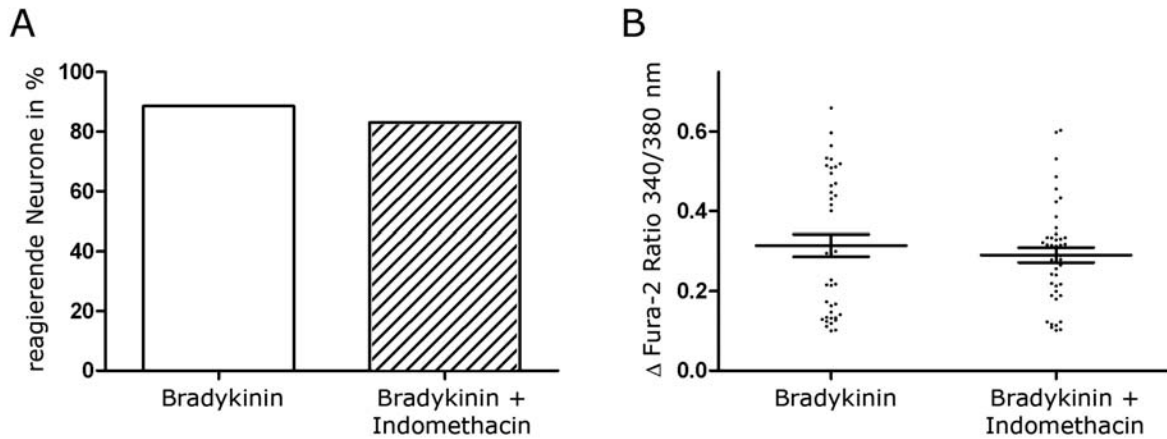


Abb. III-12: Hemmung der Prostglandinsynthese

A: Prozentualer Anteil der Neurone, die auf Bradykinin mit einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reagieren. Linker Balken: Kontroll-Versuch mit Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$); rechter Balken: Bradykinin in Gegenwart von Indomethacin ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) **B:** Amplitude des Bradykinin-induzierten Anstiegs der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Links: Effekt von Bradykinin alleine; rechts: Effekt von Bradykinin in Gegenwart von Indomethacin. Die Amplituden (breite horizontale Linien) sind als Mittelwerte dargestellt, die vertikalen Linien zeigen den jeweiligen Standardfehler SEM. Die Punkte repräsentieren die Messwerte individueller Neurone; $n = 44 - 53$.

Tabelle III-3: Effekt von Bradykinin in An- und Abwesenheit eines Cyclooxygenase-Blockers

	Anteil reagierender Neurone (%)		Amplitude des Fura-2 Ratio-Anstiegs der reagierenden Neurone		
Bradykinin \pm	- Inhibitor	+ Inhibitor	- Inhibitor	+ Inhibitor	n
Indomethacin	89	83	$0,32 \pm 0,028$	$0,29 \pm 0,019$	39 - 44

Effekt von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) allein (- Inhibitor) und in Gegenwart (+ Inhibitor) des Cyclooxygenase-Blockers Indomethacin ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Werte der Amplituden sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

2.2 Einfluss von Prostaglandinen auf die neuronal-vermittelte mucosale Cl⁻-Ionen-Sekretion

Die Ca²⁺-Imaging Ergebnisse aus III-2.1 zeigten, dass der Bradykinin-Effekt nicht Indomethacin-sensitiv ist. Dies war nach früheren Studien am Colonepithel der Ratte (Diener et al. 1988a) nicht zu erwarten. Daher folgte eine genaue Untersuchung der Bradykinin-Wirkung und des Einflusses von Prostaglandinen, indem die mucosale Cl⁻-Ionen-Sekretion am Colonepithel mit Ussingkammer-Experimenten gemessen wurde.

Von Ca²⁺-abhängigen sekretionsfördernden Substanzen wie Carbachol war bekannt, dass sie ihre Wirkung nur in Gegenwart von Prostaglandinen entfalten können (Strabel & Diener 1995). Solche Substanzen können nämlich nur dann zu einer Cl⁻-Sekretion führen, wenn apikale Cl⁻-Kanäle, die CFTR-Kanäle (cystic fibrosis transmembrane regulator), durch eine ausreichende Produktion von cAMP offen gehalten werden. Die meisten Prostaglandine können die cAMP-Konzentration ansteigen lassen, was für die Funktion der cAMP-aktivierten Protein-Kinase A wichtig ist. Diese Kinase phosphoryliert die CFTR-Kanäle und hält sie somit in einem aktivierten, also geöffneten Zustand (Greger 2000).

Um nun die Hypothese zu testen, dass die Bradykinin-Wirkung auf die Cl⁻-Sekretion zwar abhängig von Prostaglandinen ist, aber nicht durch sie vermittelt wird, wurde in Ussingkammer-Experimenten der Effekt von Bradykinin ($10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; serosale Seite) alleine und in Gegenwart von Indomethacin ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; mucosale und serosale Seite) gemessen. Wie schon zuvor berichtet (Diener et al. 1988a), reduzierte Indomethacin den Bradykinin-Effekt signifikant. Bradykinin alleine erzeugte einen Anstieg des Kurzschlussstroms von $5,72 \pm 0,93 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. In Gegenwart von Indomethacin betrug dieser nur noch $2,52 \pm 0,50 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.

In einer dritten Serie von Experimenten wurde zunächst Indomethacin ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) appliziert, was die Baseline des Kurzschlussstroms (Isc) leicht absinken ließ. Danach wurde Forskolin in einer geringen Konzentration ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; mucosale und serosale Seite) zugegeben. Forskolin, ein Aktivator der Adenylate Cyclase(n) (Seamon & Daly 1981), deren Aufgabe die cAMP-Herstellung ist, konnte die Hemmung des Isc durch Indomethacin aufheben (Abb. III-13). In Gegenwart von Indomethacin und Forskolin wurde schließlich Bradykinin appliziert. Unter diesen Voraussetzungen konnte Bradykinin den Isc um $4,03 \pm 0,67 \text{ } \mu\text{Eq} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ erhöhen. Dieser Bradykinin-Effekt auf die mucosale Cl⁻-Sekretion war nicht signifikant verschieden von Kontroll-Experimenten, bei denen Bradykinin alleine appliziert

wurde. Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die Wirkung von Bradykinin nicht durch Prostaglandine vermittelt wird, jedoch abhängig ist von deren Wirkung auf apikale Cl^- -Kanäle.

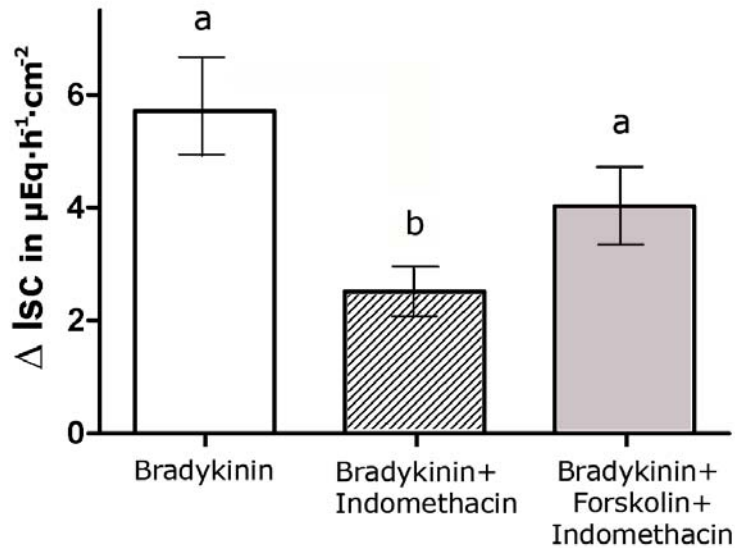


Abb. III-13: Hemmung der Prostaglandinsynthese ohne und mit Bereitstellung von cAMP

Linker Balken: Bradykinin ($10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; serosale Seite) induziert einen Anstieg des Isc (ΔIsc). **Mittlerer Balken:** Anstieg des Isc (ΔIsc) durch Bradykinin ($10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; serosale Seite) in Gegenwart von Indomethacin ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; mucosale und serosale Seite). **Rechter Balken:** Anstieg des Isc (ΔIsc) durch Bradykinin ($10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; serosale Seite) in Gegenwart von Indomethacin ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; mucosale und serosale Seite) und Forskolin ($5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; mucosale und serosale Seite). Die Balken stellen Mittelwerte dar, die vertikalen Linien den Standardfehler SEM. Statistisch homogene Gruppen sind durch den gleichen Buchstaben (a - b) gekennzeichnet; $n = 6$.

3 Identifizierung des Bradykinin-Signaltransduktionswegs

3.1 Identifizierung des an den Bradykinin-Rezeptor gekoppelten G-Proteins

Bradykinin-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Hauptsächlich kommen bei Kinin-Rezeptoren G-Proteine des Pertussis Toxin-insensitiven G_q -Typs vor. Um die Annahme zu überprüfen, dass der submucöse Bradykinin B2-Rezeptor der Ratte an ein $G_{q/11}$ -Protein gekoppelt ist, wurde der spezifische $G_{q/11}$ -Inhibitor YM-254890 (Takasaki et al. 2004) in Ca^{2+} -Imaging-Experimenten eingesetzt.

In Gegenwart von YM-254890 ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) war die Ca^{2+} -Antwort von Bradykinin fast vollständig unterdrückt (Abb. III-14), nur eines von 60 Neuronen (= 2 %) reagierte auf Bradykinin (Tabelle III-4). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Bradykinin B2-Rezeptoren von Neuronen des submucösen Plexus an ein $G_{q/11}$ -Protein gekoppelt sind.

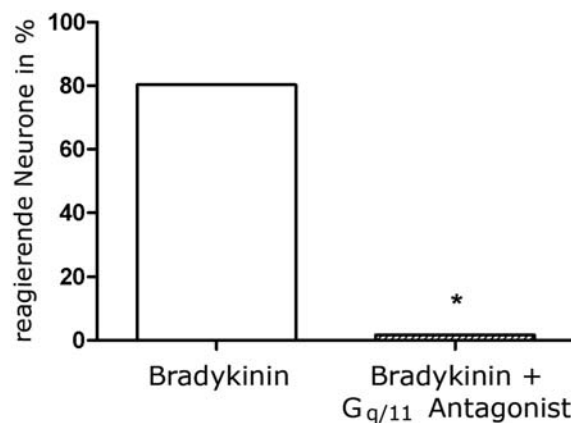


Abb. III-14: Inhibition des $G_{q/11}$ -Proteins

Prozentualer Anteil von Neuronen, die auf Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) alleine (linker Balken) und in Gegenwart des $G_{q/11}$ -Protein-Inhibitors YM-254890 ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, rechter Balken) mit einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reagieren. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin ohne Antagonist; $n = 60 - 81$.

3.2 Untersuchung des klassischen G_q -Protein-vermittelten Signalwegs

Typischerweise stimulieren $G_{q/11}$ -Proteine einen Signaltransduktionsweg, in dem das membranständige Enzym Phospholipase C aus Phospholipiden Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) generiert, was wiederum über IP_3 -Rezeptoren eine Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum (ER) hervorruft (Leeb-Lundberg et al. 2005). Um zu untersuchen, ob dieser Signalweg auch bei submucösen Neuronen der Ratte vorkommt, wurden Ca^{2+} -Imaging-Versuche an Neuronen des intakten Plexus durchgeführt, in denen die Phospholipase C und der IP_3 -Rezeptor inhibiert wurden. Zusätzlich wurde auch der Ryanodin-Rezeptor, ein weiterer intrazellulärer Ca^{2+} -Kanal, der eine Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem ER induzieren kann, inhibiert.

3.2.1 Hemmung der Phospholipase C

Die Phospholipase C wurde mit dem spezifischen Blocker U-73221 (Smith et al. 1990) inhibiert. Die Versuche zeigten, dass U-73221 ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) keinen Einfluss auf den Bradykinin-Effekt hatte. Weder der prozentuale Anteil reagierender Neurone (Abb. III-15, links; Tabelle III-4) noch die Amplitude des Fura-2 Signals waren signifikant verändert (Abb. III-15, rechts; Tabelle III-4).

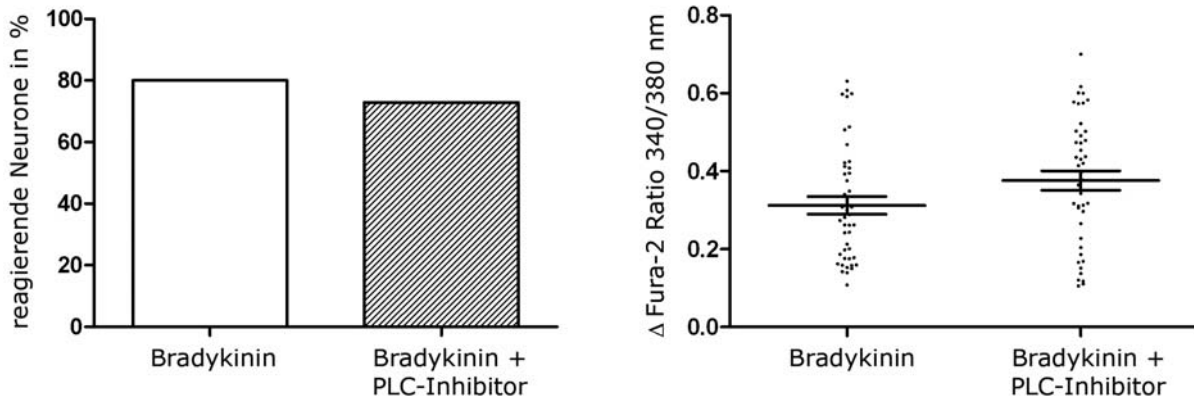


Abb. III-15: Hemmung der Phospholipase C

Links: Prozentualer Anteil von Neuronen, die auf Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) alleine (linker Balken) und in Gegenwart des Phospholipase C Inhibitors U-73221 ($10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechter Balken) mit einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reagieren. **Rechts:** Amplitude des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs. Die breiten horizontalen Linien stellen Mittelwerte dar, die vertikalen Linien den jeweiligen Standardfehler SEM. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Messwerte individueller Neurone; $n = 55 - 59$.

3.2.2 Hemmung des IP_3 - und des Ryanodin-Rezeptors

Um die Bedeutung des ERs als intrazellulären Ca^{2+} -Speicher bei der neuronalen Ca^{2+} -Antwort auf Bradykinin zu untersuchen, wurden der IP_3 -Rezeptor und der Ryanodin-Rezeptor, die beide in der Membran des ERs lokalisiert sind, geblockt. Beide Rezeptoren können nach Aktivierung eine Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem ER induzieren.

Die IP_3 -Rezeptoren wurden mit Xestospongin C, einem spezifisch wirkenden Alkaloid aus dem marinen Schwamm *Xestospongia*, inhibiert (Gafni et al. 1997). In Gegenwart von Xestospongin C ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) war der prozentuale Anteil der auf Bradykinin reagierenden Neurone leicht, aber signifikant verringert (Abb. III-16A-links; Tabelle III-4). Die Amplitude des Fura-2-Signals war nicht reduziert, sondern aus unbekannten Gründen sogar signifikant erhöht (Abb. III-16A-rechts; Tabelle II-4).

Die Ryanodin-Rezeptoren wurden mit 9,21-Dehydroryanodin, dem hauptsächlichen Bestandteil des Pflanzenalkaloids Ryanodin, geblockt (Meissner 1986). Das Dehydroryanodin ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) beeinflusste den Effekt von Bradykinin nicht. Weder der prozentuale Anteil der

auf Bradykinin reagierenden Neurone (Abb. III-16B links; Tabelle III-4) noch die Amplitude des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs waren verändert (Abb. III-16B, rechts; Tabelle III-4).

Die Ergebnisse aus beiden Antagonisten Versuchen sprechen dafür, dass eine Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern bei Neuronen des Plexus submucosus der Ratte wenn überhaupt nur von untergeordneter Bedeutung ist.

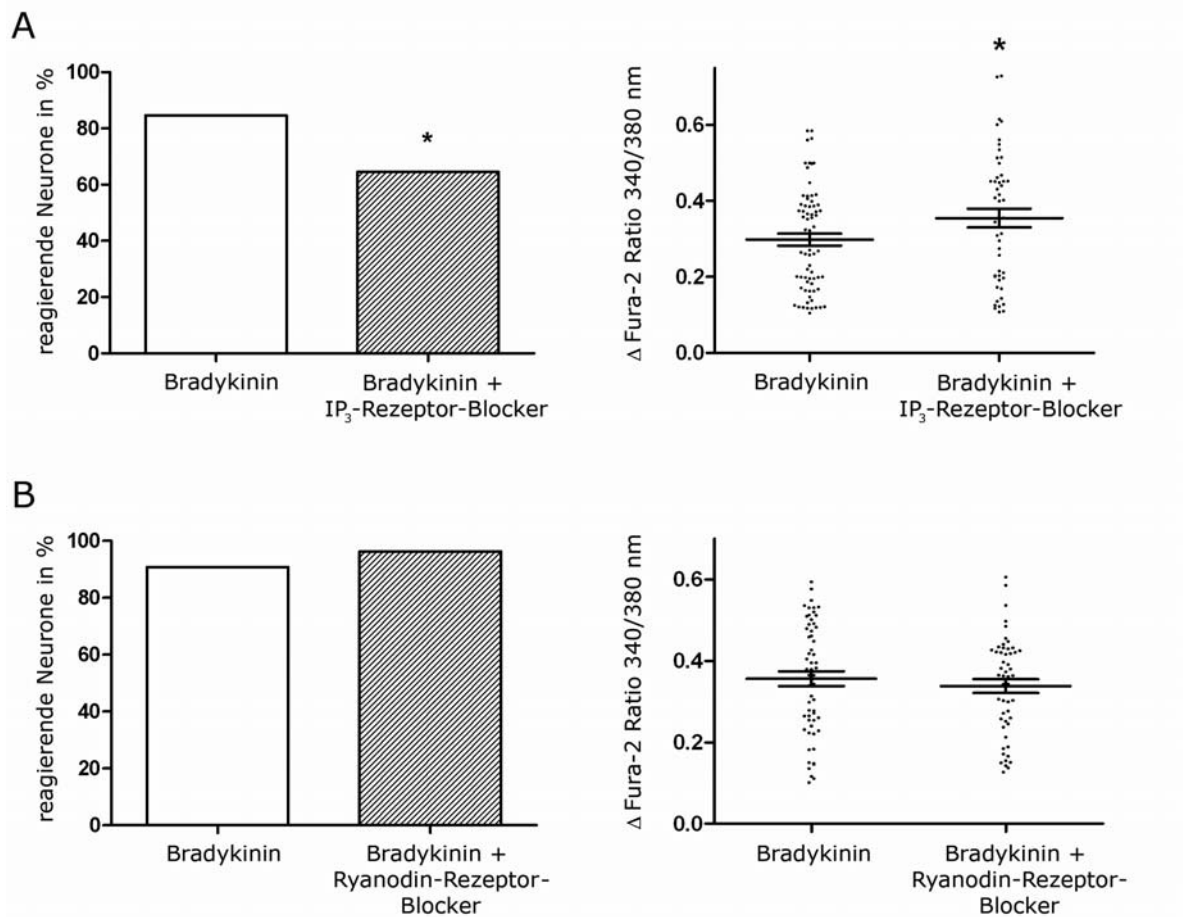


Abb. III-16: Hemmung der IP_3 - und der Ryanodin-Rezeptoren

A (links): Prozentualer Anteil von Neuronen, die auf Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) alleine (linker Balken) und in Gegenwart des IP_3 -Rezeptor-Blockers Xestospongin C ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechter Balken) mit einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reagieren. **A (rechts):** Amplitude des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs der reagierenden Neurone; $n = 78 - 93$. **B (links):** Prozentualer Anteil von Neuronen, die auf Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) alleine (linker Balken) und in Gegenwart des Ryanodin-Rezeptor-Blockers Dehydroryanodin ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechter Balken) mit einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration reagieren. **B (rechts):** Amplitude des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs der reagierenden Neurone; $n = 54 - 65$. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin ohne Antagonist. Die breiten horizontalen Linien stellen Mittelwerte dar, die vertikalen Linien den jeweiligen Standardfehler SEM. Die Punkte repräsentieren die Messwerte individueller Neurone.

Tabelle III-4: Effekt von Bradykinin in Gegenwart von verschiedenen Inhibitoren der möglicherweise durch Bradykinin angestoßenen Signaltransduktionskaskade

Bradykinin ±	Anteil reagierender Neurone (%)		Amplitude des Fura-2 Ratio-Anstiegs der reagierenden Neurone		n
	- Inhibitor	+ Inhibitor	- Inhibitor	+ Inhibitor	
YM-254890 (G _{q/11} -Blocker)	80	2 [*]	0,31 ± 0,016	0,16 ± ^a	60 - 81
U-73221 (PLC-Blocker)	80	73	0,31 ± 0,023	0,38 ± 0,025	57 - 59
Xestospongin C (IP ₃ -Rezeptor-Blocker)	85	65 [*]	0,30 ± 0,016	0,36 ± 0,025 [*]	78 - 93
Dehydroryanodin (Ryanodin-Rezeptor-Blocker)	91	96	0,36 ± 0,018	0,34 ± 0,017	54 - 65

Effekt von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Abwesenheit (- Inhibitor) und Anwesenheit (+ Inhibitor) von YM-254890 ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), U-73221 ($10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), Xestospongin C ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und Dehydroryanodin ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Werte der Amplituden sind als Mittelwerte ± SEM angegeben.

^{*} $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin ohne Antagonist. ^a Eine statistische Auswertung war nicht möglich, da nur ein Neuron in Gegenwart dieses Inhibitors auf Bradykinin reagierte.

3.3 Untersuchung alternativer Signalwege

3.3.1 Einfluss von extrazellulärem Ca^{2+}

Da der Bradykinin-induzierte Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nicht - oder nur in sehr geringem Maße - durch eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern erfolgte, wurde in den nächsten Experimenten untersucht, welche Rolle extrazelluläres Ca^{2+} bei diesem Prozess spielt.

In Ca^{2+} -Imaging-Experimenten wurde die Wirkung von Bradykinin in normaler Standard-Tyrode mit der in Ca^{2+} -freier Tyrode verglichen. Es zeigte sich eine starke Abhängigkeit des Bradykinin-Effekts von der Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (Tabelle III-5). In Ca^{2+} -freier Tyrode war sowohl der prozentuale Anteil reagierender Neurone als auch deren Amplitude des Fura-2-Signals deutlich reduziert (Abb. III-17). Zusammen mit den vorherigen Daten spricht das dafür, dass der Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Anstieg durch einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} erzeugt wird.

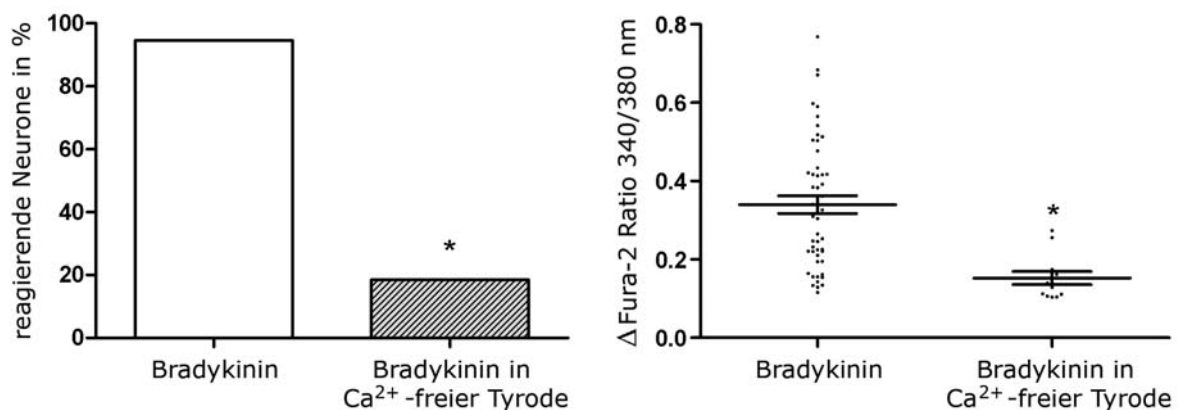


Abb. III-17: Abhängigkeit der Bradykinin-Antwort von extrazellulärem Ca^{2+}

Links: Prozentualer Anteil von Neuronen, die auf Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Standard-Tyrode (linker Balken) und auf Bradykinin in Ca^{2+} -freier Tyrode (rechter Balken) mit einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reagieren. **Rechts:** Amplitude des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs der reagierenden Neuron in Standard-Tyrode (linker Balken) und in Ca^{2+} -freier Tyrode (rechter Balken).

* $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin in normaler Tyrode. Die breiten horizontalen Linien stellen Mittelwerte dar, die vertikalen Linien den jeweiligen Standardfehler SEM. Die Punkte repräsentieren die Messwerte individueller Neurone; $n = 56 - 76$.

Tabelle III-5: Effekt von Bradykinin in Abhängigkeit von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

	Anteil reagierender Neurone (%)	Amplitude des Fura-2 Ratio-Anstiegs der reagierenden Neurone	n
Bradykinin + Standard-Tyrode (Ca^{2+} -haltig)	95	$0,34 \pm 0,023$	56
Bradykinin + Ca^{2+} -freie Tyrode	18*	$0,15 \pm 0,167^*$	78

Effekt von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Gegenwart von extrazellulärem Ca^{2+} (Standard-Tyrode) und in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} (Ca^{2+} -freie Tyrode). Die Werte der Amplituden sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin in normaler Tyrode.

3.3.2 Beteiligung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Ca_v -Kanälen)

Der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als Antwort auf Bradykinin ist stark abhängig von extrazellulären Ca^{2+} -Ionen (III-3.1). In den folgenden Imaging-Experimenten wurde die Rolle von sogenannten spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (Ca_v -Kanälen) bei der Vermittlung des Ca^{2+} -Einstroms aus dem Extrazellularraum untersucht. Dabei wurde der Effekt von Bradykinin alleine und in Gegenwart der di- bzw. trivalenten Kationen Ni^{2+} und La^{3+} gemessen.

Ni^{2+} ist ein nicht-selektiver Blocker aller Ca_v -Kanäle, er hemmt die Subtypen L, R, P/Q und N, die durch eine hohe Spannung aktiviert werden (Zamponi et al. 1996) und auch den T-Subtyp, der bereits bei geringen Spannungen aktiviert wird (Obejero-Paz et al. 2008). In Gegenwart von Ni^{2+} (10^{-3} und $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) war sowohl der prozentuale Anteil der auf Bradykinin reagierenden Neurone (Abb. III-18A) als auch deren Amplitude des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs signifikant reduziert (Abb. III-18B).

La^{3+} ist ein weiterer nicht-selektiver Blocker der Ca_v -Kanäle (Pelzer et al. 1990). Auch in Gegenwart von La^{3+} (10^{-3} und $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) waren sowohl die reagierenden Neurone als auch die Amplitude des Ca^{2+} -Anstiegs signifikant reduziert (Abb. III-18 C, D). Die Ergebnisse dieser Inhibitoren-Versuche zeigen deutlich, dass Ca_v -Kanäle den Bradykinin-induzierten Einstrom von Ca^{2+} vermitteln. Die exakten Werte sind jeweils in Tabelle III-6 aufgeführt.

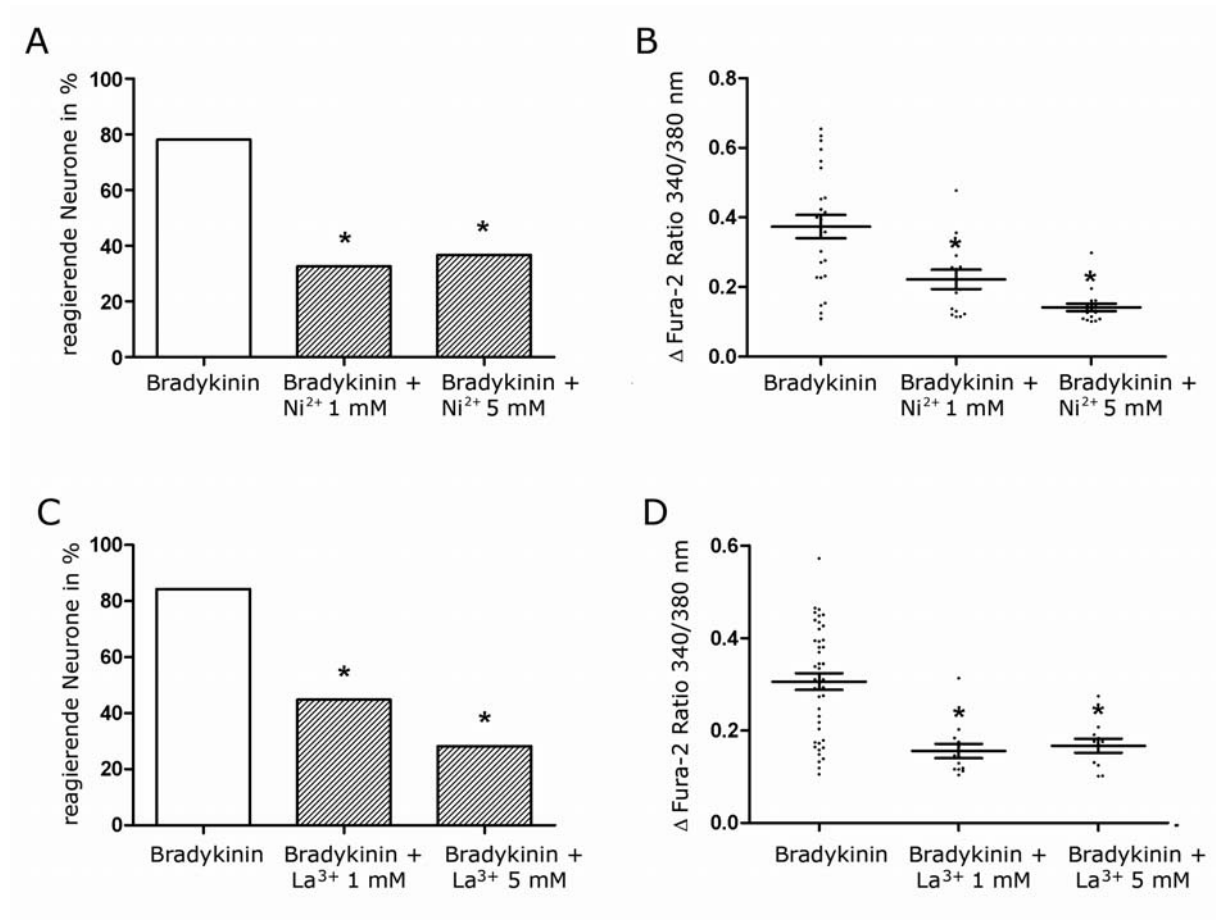


Abb. III-18: Nicht-selektive Hemmung der Ca_v -Kanäle durch die Kationen Ni^{2+} und La^{3+}

A: Prozentualer Anteil der auf Bradykinin reagierenden Neurone. Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) alleine (linker Balken) und in Gegenwart von Ni^{2+} ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; mittlerer Balken und $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; rechter Balken); n = 32 - 49. **B:** Darstellung der Amplituden des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs der in A reagierenden Neurone **C:** Auf Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) alleine (linker Balken) und in Gegenwart von La^{3+} ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; mittlerer Balken und $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$; rechter Balken) reagierende Neurone in Prozent; n = 29 - 51. **D:** Amplituden des Ca^{2+} -Anstiegs der reagierenden Neurone aus C. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin alleine. Die breiten horizontalen Linien stellen Mittelwerte dar, die vertikalen Linien den jeweiligen Standardfehler SEM. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Messwerte individueller Neurone.

Tabelle III-6: Effekt von Bradykinin allein und in Gegenwart verschiedener nicht-selektiver Ca_v -Kanal-Inhibitoren

Bradykinin \pm	Anteil reagierender Neurone (%)		Amplitude des Fura-2 Ratio-Anstiegs der reagierenden Neurone		n
	- Inhibitor	+ Inhibitor	- Inhibitor	+ Inhibitor	
Ni^{2+} ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	78	32*	$0,37 \pm 0,033$	$0,22 \pm 0,028^*$	32 - 46
Ni^{2+} ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	78	36*	$0,37 \pm 0,033$	$0,14 \pm 0,011^*$	32 - 49
La^{3+} ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	84	45*	$0,31 \pm 0,018$	$0,16 \pm 0,016^*$	39 - 51
La^{3+} ($5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	84	28*	$0,31 \pm 0,018$	$0,17 \pm 0,015^*$	39 - 51

Effekt von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Abwesenheit (- Inhibitor) und Anwesenheit (+ Inhibitor) der nicht-selektiven Ca_v -Kanal-Inhibitoren Ni^{2+} und La^{3+} . Die Werte der Amplituden sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin ohne Antagonist.

3.3.3 Subtyp-Identifizierung der beteiligten Ca_v -Kanäle

Um zu identifizieren, welche der sechs bekannten Ca_v -Kanal-Subtypen den Bradykinin-induzierten Ca^{2+} -Einstrom vermitteln, wurden selektive Inhibitoren für jeden einzelnen Kanal eingesetzt (für eine Übersicht der verwendeten Toxine, siehe: Dolphin 1995, Miljanich & Ramachandran 1995, Mori et al. 1996, Adams 2004, Catterall et al. 2005).

Der P-Subtyp wurde mit ω -Agatoxin IVA, einem synthetisch hergestellten Peptid, das ursprünglich aus der Spinne *Agelenopsis aperta* isoliert wurde, gehemmt. Der Effekt von Bradykinin wurde durch ω -Agatoxin IVA ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) nicht beeinflusst (Abb. III-19A; Tabelle III-7). Durch Blockieren des R-Subtyps mit SNX-482 ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) wurde die Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Antwort ebenfalls nicht verändert (Abb. III-19B; Tabelle III-7). SNX-482 ist ein Toxin, das aus der afrikanischen Tarantel *Hysteroecrates gigas* isoliert wurde (Newcomb et al. 1998). Auch der T-Subtyp-Inhibitor Flunarizin ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) (Takahashi & Akaike 1991, Akaike et al. 1989) war wirkungslos (Abb. III-19C; Tabelle III-7). Diese

Ergebnisse zeigen, dass die Ca_v -Kanäle vom P-, R- und T-Subtyp nicht am Bradykinin-induzierten Ca^{2+} -Einstrom in submucösen Neuronen der Ratte beteiligt sind.

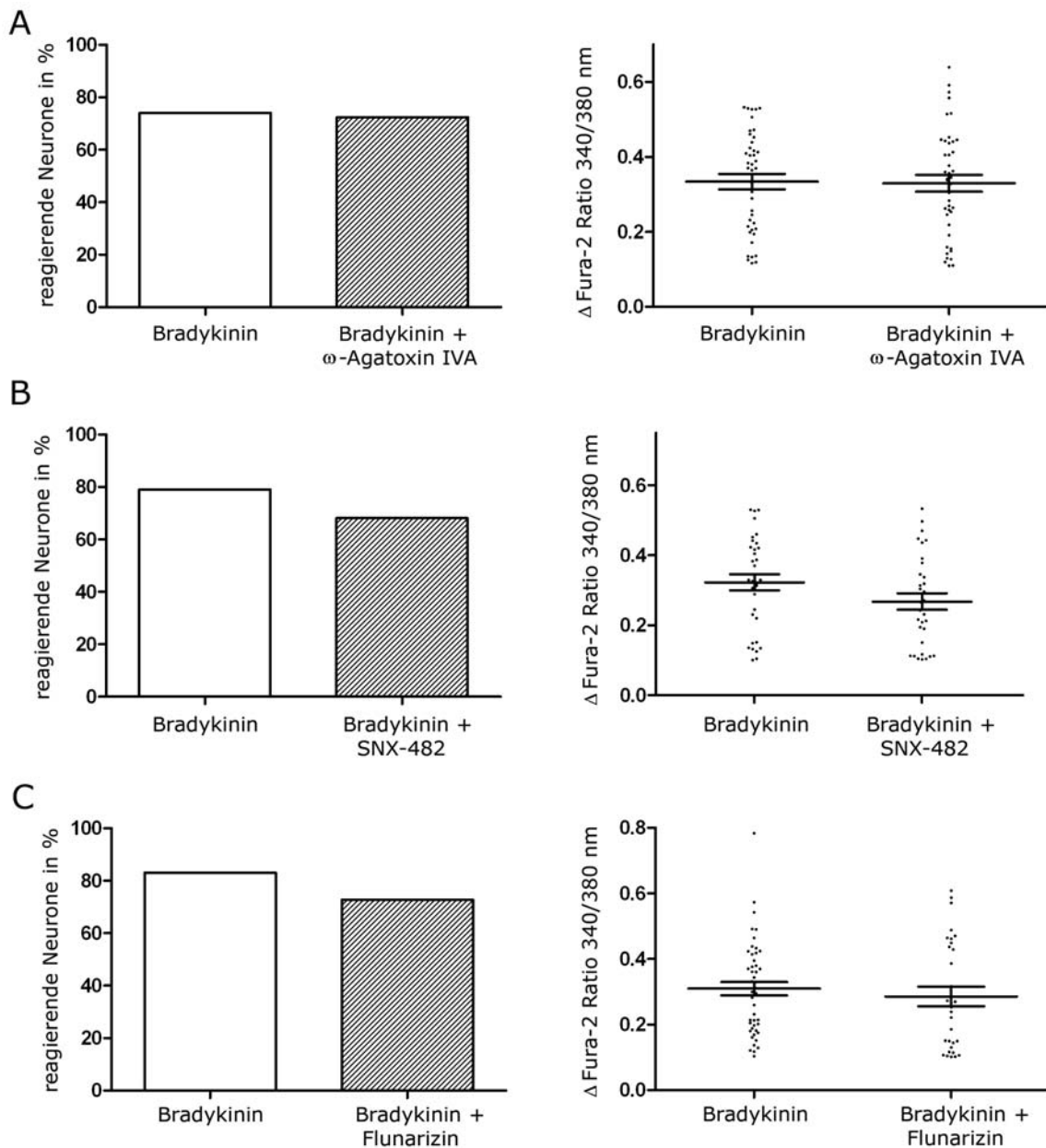


Abb. III-19: Hemmung der Ca_v -Kanäle des Subtyps P, R und T

Der Effekt von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) wurde durch Hemmung der Ca_v -Kanal-Subtypen P, R und T nicht beeinflusst. In Gegenwart der jeweiligen Antagonisten (jeweils rechter Balken bzw. Linie) waren sowohl der Anteil reagierender Neurone (jeweils linke Abbildung) als auch deren Amplitude des cytosolischen Ca^{2+} -Anstiegs (jeweils rechte Abbildung) unverändert. **A:** Hemmung des P-Subtyps mit ω -Agatoxin IVA ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; $n = 58$). **B:** Hemmung des R-Subtyps mit SNX-482 ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; $n = 43 - 47$). **C:** Hemmung des T-Subtyps mit Flunarizin ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; $n = 44 - 59$). Die breiten horizontalen Linien stellen Mittelwerte dar, die vertikalen Linien den Standardfehler SEM. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Messwerte individueller Neurone.

Die Blockierung des Ca_v -Kanal-Subtyps L durch Verapamil ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) führte zu einer signifikant reduzierten Amplitude des Bradykinin-induzierten Ca^{2+} -Anstiegs (Abb. III-20A; Tabelle III-7). Der Anteil an reagierenden Zellen war nicht verändert (Abb. III-20A; Tabelle III-7). Die N- und Q-Subtypen wurden mit verschiedenen Conotoxinen, die ursprünglich aus fischjagenden marinen Kegelschnecken isoliert wurden (Olivera et al. 1985, Olivera et al. 1994), selektiv gehemmt. Auch der Inhibitor des N-Subtyps, ω -Conotoxin GVIA ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), reduzierte die durch Bradykinin ausgelöste Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration signifikant, während die Anzahl reagierender Neurone gleich blieb (Abb. III-20B; Tabelle III-7). Der Q-Subtyp-Inhibitor ω -Conotoxin MVIIC ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) reduzierte den Anteil an Neuronen, die auf Bradykinin reagierten, während die Amplitude der Ca^{2+} -Antwort unbeeinflusst blieb (Abb. III-20C; Tabelle III-7).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Ca_v -Kanäle des L-, N- und Q-Subtyps den Bradykinin-induzierten Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} vermitteln. Dies steht im Einklang mit immunhistochemischen Daten, die ebenfalls die Präsenz des L-, N- und (weniger stark ausgeprägt) auch des P/Q-Subtyps in submucösen Neuronen der Ratte belegen (Kirchgessner & Liu 1999).

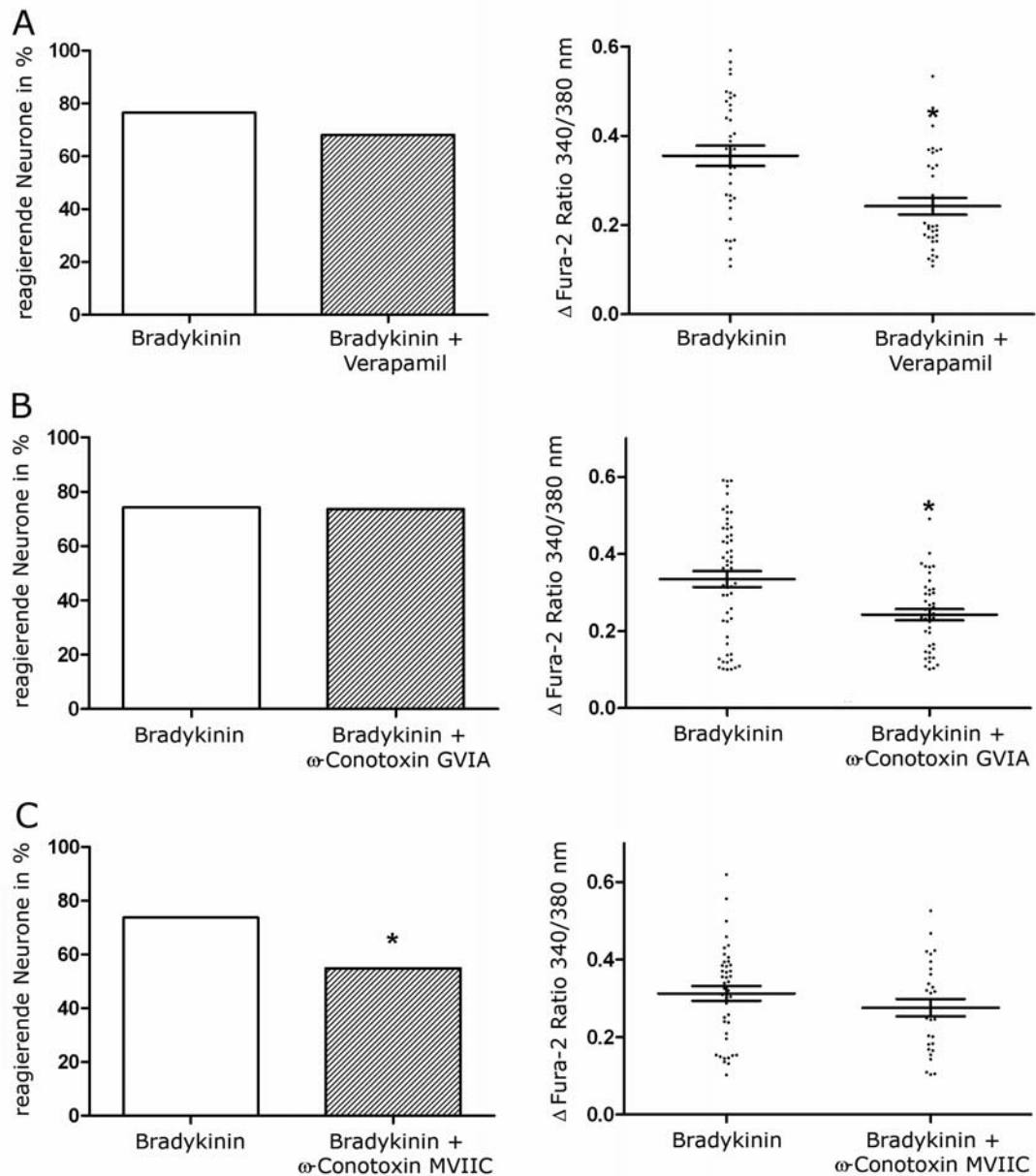


Abb. III-20: Hemmung der Ca_v -Kanäle des Subtyps L, N und Q

A: Die Hemmung des L-Subtyps mit Verapamil ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) führte zu einer signifikant reduzierten Amplitude des Bradykinin-induzierten Ca^{2+} -Anstiegs (rechte Abbildung, rechter Balken). Die Zahl der auf Bradykinin reagierenden Neurone wurde nicht beeinflusst (linke Abbildung); $n = 47$. **B:** Die Hemmung des N-Subtyps mit ω -Conotoxin GVIA ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) verringerte ebenfalls die Amplitude des Ca^{2+} -Anstiegs signifikant (rechte Abbildung, rechter Balken), hatte aber keinen Effekt auf den Anteil der reagierenden Neurone (linke Abbildung); $n = 57 - 73$. **C:** Die Hemmung des Q-Subtyps mit ω -Conotoxin MVIIC ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) reduzierte den prozentualen Anteil der auf Bradykinin reagierenden Neurone signifikant (linke Abbildung, rechter Balken), während die Amplitude des Ca^{2+} -Anstiegs nicht verändert wurde; $n = 51 - 57$. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin alleine. Die breiten horizontalen Linien stellen Mittelwerte dar, die vertikalen Linien den Standardfehler SEM. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Messwerte individueller Neurone.

Im nächsten Experiment wurde der Effekt von Bradykinin während der gleichzeitigen Präsenz aller drei wirksamen Ca_v -Kanal-Blocker untersucht. Die Kombination aus Verapamil ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), ω -Conotoxin GVIA ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und ω -Conotoxin MVIIC ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) führte dazu, dass nur noch 21 % der Neurone auf Bradykinin reagierten (Abb. III-21 A; Tabelle III-7). Der erzeugte Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den verbliebenen reagierenden Zellen war ebenfalls deutlich reduziert (Abb. III-21 B; Tabelle III-7). Diese inhibitorische Wirkung war deutlich größer als durch eine Addition der Einzeleffekte zu erwarten gewesen wäre. Die gleichzeitige Hemmung aller beteiligten Ca_v -Kanal-Subtypen führt also zu einem verstärkten inhibitorischen Effekt, der darauf hindeutet, dass, wenn nur ein Ca_v -Kanal-Subtyp geblockt ist, der Ca^{2+} -Einstrom teilweise von den verbliebenen aktiven Ca_v -Kanälen mitübernommen werden kann.

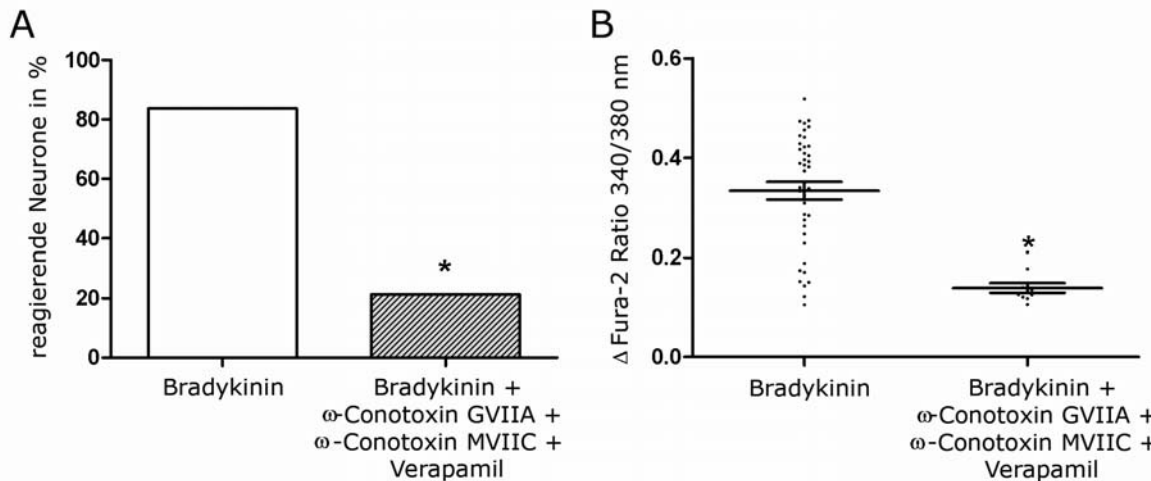


Abb. III-21: Gleichzeitige Hemmung aller drei beteiligten Ca_v -Kanal-Subtypen

Die gleichzeitige Hemmung der Subtypen L, N und Q mit Verapamil ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), ω -Conotoxin GVIA ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) und ω -Conotoxin MVIIC ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) führte in submucösen Neuronen zu einer starken Reduzierung des Bradykinin-Effekts; $n = 47 - 49$. **A:** In Gegenwart der drei Inhibitoren war der prozentuale Anteil der auf Bradykinin reagierenden Neurone (rechter Balken) gegenüber der Kontrolle mit Bradykinin alleine (linker Balken) stark reduziert. **B:** Auch die Amplitude des Ca^{2+} -Anstiegs war durch die drei Ca_v -Kanal-Inhibitoren deutlich reduziert. * $P < 0,05$ im Vergleich zu Bradykinin alleine. Die breiten horizontalen Linien stellen Mittelwerte dar, die schmalen horizontalen Linien den Standardfehler SEM. Die Punkte repräsentieren die einzelnen Messwerte individueller Neurone.

Tabelle III-7: Effekt von Bradykinin in Gegenwart von selektiven Inhibitoren der einzelnen Ca_v -Kanal-Subtypen

Bradykinin \pm	Anteil reagierender Neurone (%)		Amplitude des Fura-2 Ratio-Anstiegs der reagierenden Neurone		n
	- Inhibitor	+ Inhibitor	- Inhibitor	+ Inhibitor	
Flunarizin (T-Subtyp-Inhibitor)	83	73	$0,31 \pm 0,020$	$0,29 \pm 0,030$	44 - 59
SNX-482 (R-Subtyp-Inhibitor)	79	68	$0,32 \pm 0,023$	$0,27 \pm 0,024$	43 - 47
Verapamil L-Subtyp-Inhibitor	77	68	$0,36 \pm 0,023$	$0,24 \pm 0,019^*$	47
ω -Conotoxin GVIA (N-Subtyp-Inhibitor)	74	74	$0,34 \pm 0,021$	$0,24 \pm 0,015^*$	57 - 73
ω -Conotoxin MVIIC (Q-Subtyp-Inhibitor)	74	55*	$0,31 \pm 0,019$	$0,28 \pm 0,022$	51 - 57
ω -Agatoxin IVA (P-Subtyp-Inhibitor)	74	72	$0,33 \pm 0,020$	$0,33 \pm 0,022$	58
Verapamil + ω -Conotoxin GVIA + ω -Conotoxin MVIIC	84	21*	$0,33 \pm 0,018$	$0,14 \pm 0,010^*$	47 - 49

Effekt von Bradykinin ($2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) in Abwesenheit (- Inhibitor) und Anwesenheit (+ Inhibitor) von Flunarizin ($2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), SNX-482 ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), Verapamil ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), ω -Conotoxin GVIA ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), ω -Conotoxin MVIIC ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und ω -Agatoxin IVA ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Die Werte der Amplituden sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. * $P < 0,05$ im Vergleich zur Wirkung von Bradykinin ohne Antagonist.

4 Etablierung der primären submucösen Zellkultur

Im Allgemeinen werden Ca_v -Kanäle durch eine Depolarisation der Zellmembran aktiviert (Catterall et al. 2005). Daher sollte im nächsten Schritt herausgefunden werden, ob Bradykinin das Membranpotential submucöser Neurone verändert, wodurch es im Anschluss zu einer Öffnung von Ca_v -Kanälen kommt. Das Membranpotential einer Zelle lässt sich mit dem elektrophysiologischen Whole-Cell Patch-Clamp-Verfahren untersuchen. Da Patch-Clamp-Experimente an Neuronen innerhalb des intakten Gewebeverbandes des Plexus submucosus, in dem sie in Ganglien organisiert und von Bindegewebe umgeben sind, nicht möglich sind, mussten die Zellen isoliert werden, um freien Zugang zur Zelloberfläche zu erhalten. Dazu wurde eine primäre Zellkultur submucöser Neurone etabliert.

4.1 Basale immunhistochemische Charakterisierung der isolierten kultivierten submucösen Neurone

Mit Hilfe von immunocytochemischen Markierungen wurden die in der primären submucösen Zellkultur vorkommenden Zelltypen identifiziert. Neurone wurden aufgrund der Expression des neuronalen Markers PGP9.5 detektiert, während Gliazellen durch den Nachweis des glialen Markers GFAP identifiziert wurden. Die immunocytochemischen Färbungen zeigten, dass in der Kultur sowohl Neurone als auch Gliazellen vorkamen. Die submucösen Nervenzellen wuchsen oft auf einer Schicht aus anderen Zellen - wahrscheinlich Fibroblasten - und waren teilweise miteinander über lange Nervenfaserverstränge verbunden (Abb. III-22A). Oft besaßen Neurone mehr als einen langen Fortsatz (Abb. III-22A). Teilweise standen die Neurone mit ihren Zellfortsätzen mit Gliazellen in Verbindung (Abb. III-22B). Die Form der Gliazellen variierte von kugelig rund bis dünn und langgestreckt (Abb. III-22C).

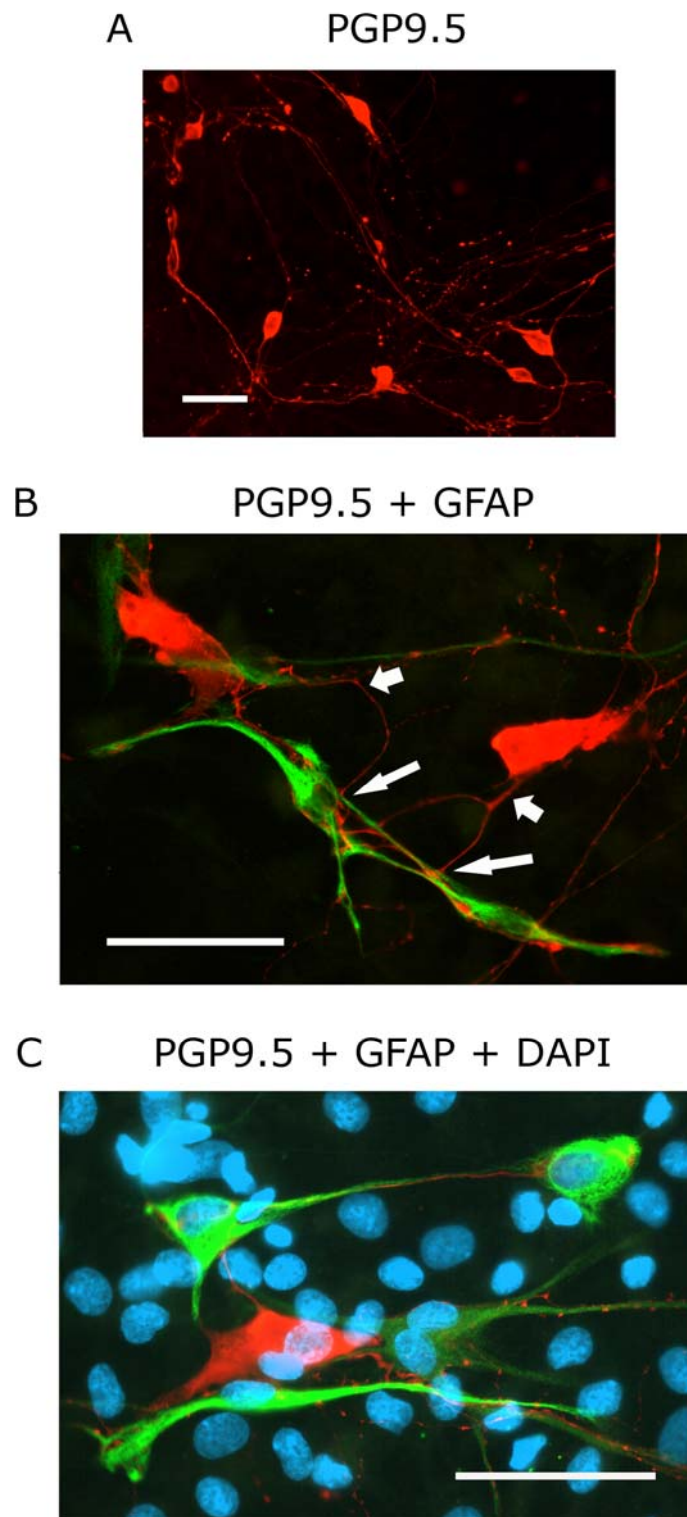


Abb. III-22: Immunocytochemische Markierung von isolierten primär kultivierten Neuronen bzw. Gliazellen des Plexus submucosus

A: Submucöse Neurone (rot; PGP9.5) sind durch Nervenfaserverstränge miteinander verbunden. **B:** Aus den Neuronen (rot) entspringen Fortsätze (kurze Pfeile), die in Kontakt mit den Gliazellen (grün; GFAP) stehen (lange Pfeile). **C:** Dreifach-Markierung von Neuronen (rot), Gliazellen (grün) und Zellkernen (blau; DAPI). Die Form der Gliazellen ist variabel. Eichbalken = 50 µm

4.2 Immuncytochemischer Nachweis der Bradykinin-Rezeptoren

Um herauszufinden, welche Bradykinin-Rezeptoren in kultivierten submucösen Neuronen und Gliazellen vorkommen, wurden Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen PGP9.5 bzw. GFAP und den Bradykinin B1- bzw. B2-Rezeptor durchgeführt. Die immuncytochemischen Markierungen innerhalb des intakten Plexus submucosus (siehe III-1.4.2) zeigten, dass Bradykinin B2-Rezeptoren, aber nicht Bradykinin B1-Rezeptoren in Neuronen vorkommen, während Gliazellen im intakten Gewebe keine Bradykinin B2-Rezeptoren besitzen.

Doppelfärbungen an isolierten Zellen ergaben, dass dies auch in der Zellkultur der Fall ist. Das heißt, kultivierte submucöse Neurone besitzen den Bradykinin B2-Rezeptor (Abb. III-23A), aber nicht den Bradykinin B1-Rezeptor (Abb. III-23B). Kultivierte Gliazellen zeigten ebenfalls kein Signal für den Bradykinin B2-Rezeptor (Abb. III-24), was darauf hinweist, dass Gliazellen in diesem Bereich des enterischen Nervensystems nicht auf Bradykinin reagieren und somit nicht an den neuronalen Bradykinin-Effekten beteiligt sind.

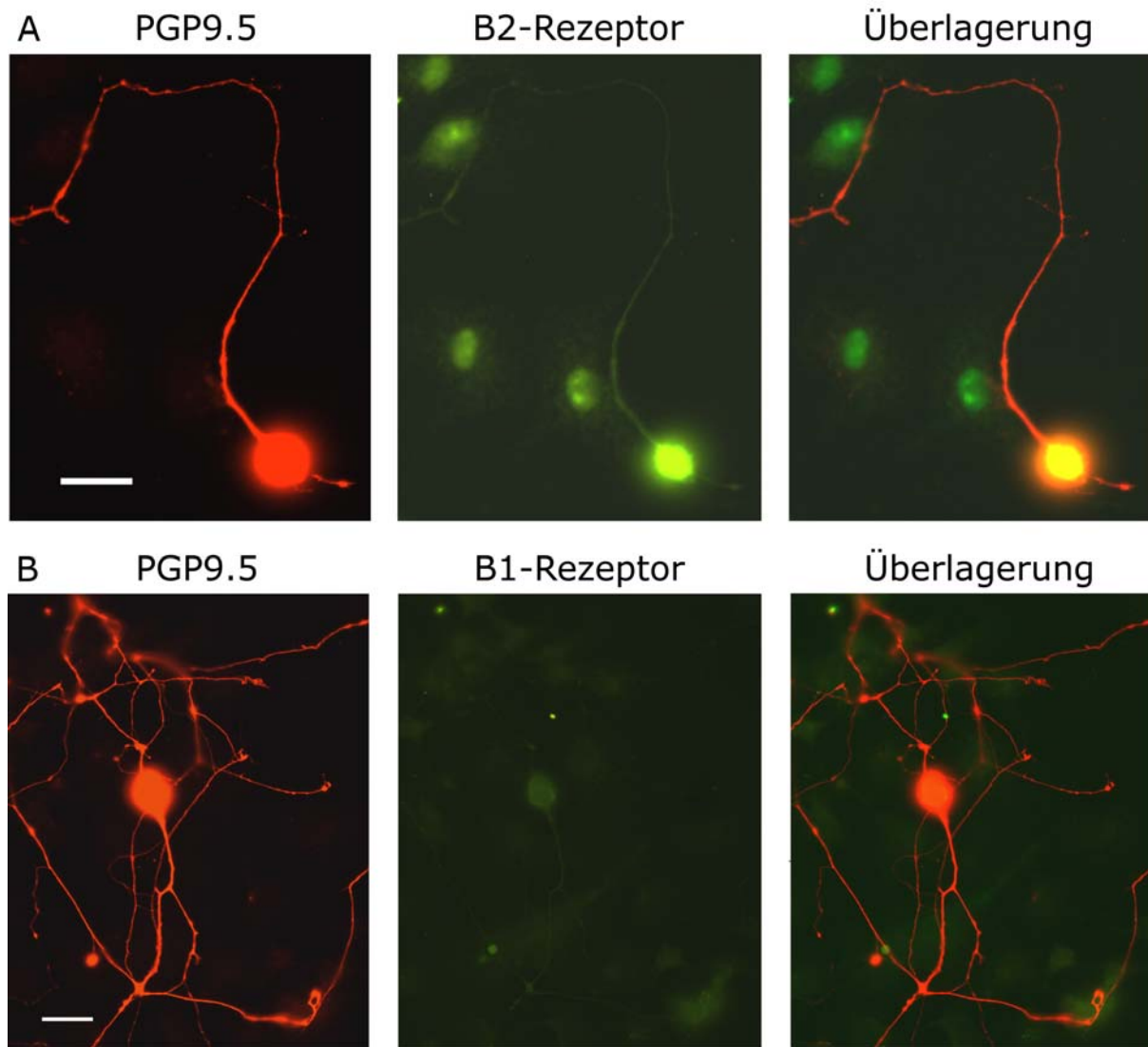


Abb. III-23: Immunocytochemische Doppelmarkierungen von kultivierten submucösen Neuronen und Bradykinin-Rezeptoren

A: Doppelmarkierung von Bradykinin B2-Rezeptoren und Neuronen. **Links:** Ein durch PGP9.5 rot dargestelltes Neuron. **Mitte:** Der B2-Rezeptor ist gut erkennbar grün angefärbt. **Rechts:** Eine Überlagerung der beiden vorherigen Bilder, bei dem eine deutliche Gelbfärbung erkennbar ist. Das gelbe Signal entsteht durch eine Colokalisation der grün fluoreszierenden B2-Rezeptor-Signale mit den rot fluoreszierenden Signalen der Neurone. **B:** Doppelmarkierung von Bradykinin B1-Rezeptoren und Neuronen. **Links:** Ein durch PGP9.5 rot markiertes Neuron. **Mitte:** Außer einer unspezifischen Hintergrundfärbung (grün) ist kein Signal des Bradykinin B1-Rezeptors zu erkennen. **Rechts:** Bei der Überlagerung der ersten beiden Bilder erscheint keine gelbe Farbe, die aus einer Colokalisation entstehen würde. Eichbalken = 20 µm



Abb. III-24: Immunocytochemische Doppelmarkierung von kultivierten submucösen Gliazellen und dem Bradykinin B2-Rezeptor

Links: Gliazellen sind mit GFAP rot markiert. **Mitte:** Der Bradykinin B2-Rezeptor ist grün dargestellt. **Rechts:** Eine Überlagerung der beiden vorherigen Bilder lässt keine gelbe Farbe entstehen, die aus einer Colokalisation von Gliazellen und Bradykinin B2-Rezeptoren resultieren würde. Eichbalken = 50 μ m

5 Effekt von Bradykinin auf isolierte submucöse Neurone

Da Bradykinin B2-Rezeptoren in isolierten submucösen Neuronen auch während der Kultur vorhanden waren und Bradykinin B1-Rezeptoren weiterhin fehlten, waren diese Zellen geeignet, um weitere Untersuchungen zur Wirkung von Bradykinin mittels der Whole-Cell Patch-Clamp-Technik durchzuführen. Hierbei wurde der Effekt von Bradykinin auf das Membranpotential und die verschiedenen Ionenströme untersucht.

5.1 Effekt von Bradykinin auf das Membranpotential isolierter submucöser Neurone

Unter Durchlicht ließen sich die isolierten Neurone morphologisch nicht eindeutig von anderen submucösen Zelltypen innerhalb der Kultur unterscheiden, daher wurden sie nach einer vorläufigen optischen Auswahl durch Erstellen einer IV-Kurve zweifelsfrei identifiziert. Dazu wurde nach Erlangen der Whole-Cell-Konfiguration in den Voltage-Clamp-Modus gewechselt und Spannungspulse von -80 mV bis +80 mV appliziert. Nur bei erregbaren Zellen wie Neuronen entsteht bei ausreichend positiven Spannungswerten ein schneller

transienter Einstrom von Na^+ -Ionen, der nach der Vorzeichenkonvention einen negativen Strom erzeugt. Dieser ist erkennbar an einem negativen Ausschlag in der IV-Kurve (Abb. III-25).

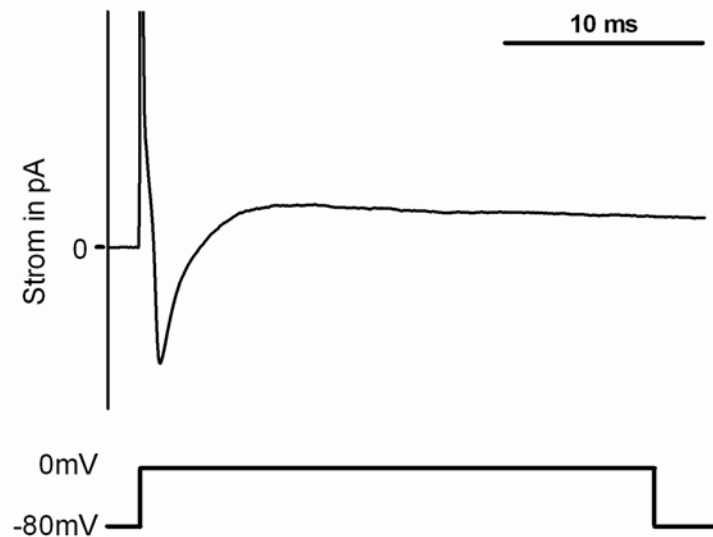


Abb. III-25: Identifikation eines Neurons durch Applikation eines Spannungspulses

Durch Applikation eines rechteckförmigen Spannungspulses von -80 mV auf 0 mV (untere Kurve) entsteht ausschließlich in Neuronen ein transienter Einwärtsstrom (negativer Ausschlag in der oberen Kurve).

Um nun die Frage zu klären, ob der Bradykinin-induzierte Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in submucösen Neuronen durch eine Depolarisation der Zelle ausgelöst wird, wurde das Membranpotential im Current-Clamp-Modus ohne Anlegen eines Stroms gemessen. Nach dem Erreichen der Whole-Cell-Konfiguration und nachdem sich eine stabile Grundlinie des Membranpotentials eingestellt hatte, wurde Bradykinin zugegeben. Das durchschnittliche Membranpotential von 17 Neuronen in normaler Tyrodelösung betrug $-50,6 \pm 3,0$ mV, wobei sich die Werte des Membranpotentials von -29,0 mV bis -75,0 mV erstreckten. Das durchschnittliche Membranpotential von -50,6 mV ist dem submucöser Neurone aus der Maus mit $-55,8 \pm 1,3$ mV (Wong et al. 2008) sehr ähnlich.

Neun Neurone, deren Ruhemembranpotential $-51,5 \pm 5,5$ mV betrug, wurden mit Bradykinin haltiger Tyrodelösung superfundiert. Bradykinin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) erzeugte in 66 % der Zellen eine Depolarisation der Membran. Innerhalb weniger Minuten nach Beginn der

Superfusion stieg das Membranpotential um $14,2 \pm 4,6$ mV an und erreichte einen Wert von $-40,4 \pm 8,2$ mV ($n = 6$).

In Abb. III-26 ist eine Original-Kurve des Membranpotentials vor, während und nach der Bradykinin-Zugabe dargestellt. Der Verlauf der Bradykinin-induzierten Depolarisation reichte von einem kurzen Peak bis zu einer länger andauernden Erhöhung, die erst mit Auswaschen des Kinins beendet wurde. Drei von neun Neuronen reagierten gar nicht auf Bradykinin. Dieses Ergebnis passt zu Ca^{2+} -Imaging-Experimenten, in denen ca. 20 % der Neurone nicht auf Bradykinin anworteten.

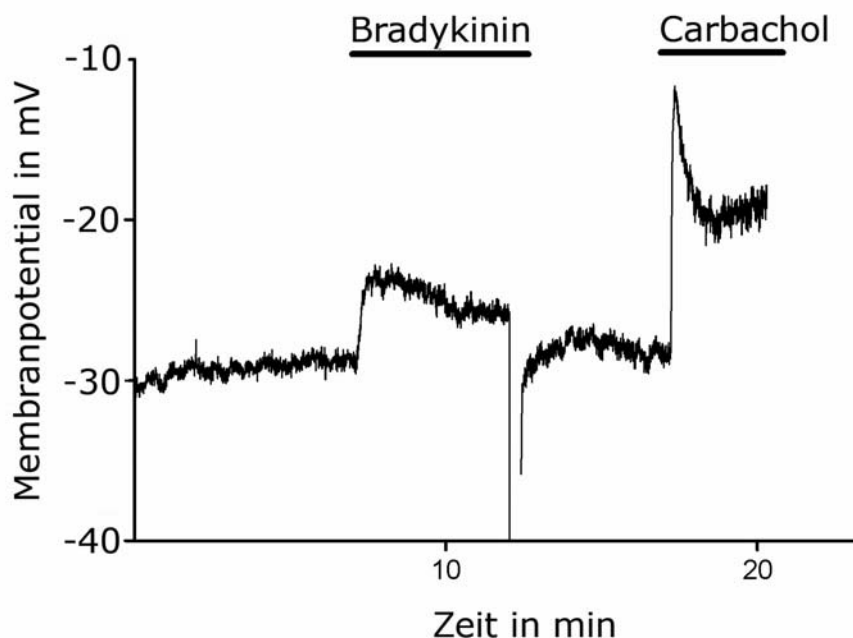


Abb. III-26: Original-Kurve des Membranpotentials eines kultivierten submucösen Neurons

Nach einer Äquilibrationsphase wurde Bradykinin (10^{-7} mol·l⁻¹; linker schwarzer Balken) superfundiert, was zu einer Depolarisation des Neurons führte. Carbachol ($5 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹; rechter schwarzer Balken) wurde als Vitalitätskontrolle verwendet, es erzeugte eine starke Depolarisation. Die Unterbrechung der Kurve am Ende der Bradykinin-Superfusion stellt ein Messartefakt dar, das durch Messung von Strom-Spannungskurven im Voltage-Clamp-Modus entstand.

5.2 Effekt von Bradykinin auf die Ionenströme isolierter submucöser Neurone

Die Bradykinin-induzierte Depolarisation kann durch verschiedene Mechanismen entstehen. Denkbar wäre, dass sich als Reaktion auf die Bindung von Bradykinin an den Bradykinin B2-Rezeptor Na^+ -Kanäle oder unselektive Kationen-Kanäle öffnen, wodurch ein Einstrom von Na^+ erzeugt wird. Dies ist bei DRG (dorsal root ganglion) Neuronen der Ratte der Fall (Burgess et al. 1989). Aber auch ein Schließen von K^+ -Kanälen, mit der Folge eines verminderten Ausstroms von K^+ -Ionen aus dem Cytosol, oder sogar ein Öffnen von Cl^- -Kanälen (Oh & Weinreich 2004) mit Ausstrom negativ geladener Cl^- -Teilchen, was beides bei vagalen Neuronen des Meerschweinchens beobachtet wurde (Oh & Weinreich 2004), kann zu einer Depolarisation führen.

Um herauszufinden, welche Ionenkanäle an der Entstehung der durch Bradykinin erzeugten Depolarisation beteiligt sind, wurde ein Doppelpuls-Protokoll angewendet. Bei diesem Protokoll wurden die Neurone abwechselnd auf zwei verschiedene Haltepotentiale geklemmt und der dabei fließende Strom kontinuierlich erfasst. Während des Potentials von -81 mV, was dem Gleichgewichtspotential von K^+ entspricht, können K^+ -Ströme aufgrund der fehlenden Antriebskraft nicht fließen und somit nicht zu dem gesamten Membranstrom beitragen. Bei 0 mV, dem Gleichgewichtspotential für unselektive Kationen-Kanäle (wenn die Konzentration von permeablen Kationen auf beiden Seiten der Membran gleich ist), können hingegen keine Na^+ -Ströme fließen.

Die Superfusion mit Bradykinin ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) erzeugte bei einem Haltepotential von -81 mV keine Veränderung des über die Membran fließenden Stroms (Abb. III-27). Das bedeutet, Bradykinin hat keinen Effekt auf den Einwärts-Strom, der hauptsächlich aus Na^+ -Bewegungen besteht. Der bei 0 mV fließende Strom, der von einem K^+ -Ausstrom dominiert wird, wurde in Gegenwart von Bradykinin hingegen signifikant reduziert (Abb. III-27). Bradykinin reduzierte in allen sieben gemessenen Neuronen den K^+ -Ausstrom um $26,4 \pm 3,5 \%$. Bevor Bradykinin appliziert wurde, betrug der durchschnittliche Strom während des Haltepotentials von 0 mV $2582 \pm 520 \text{ pA}$, während er in Gegenwart von Bradykinin auf $1874 \pm 370 \text{ pA}$ reduziert wurde ($n = 7$).

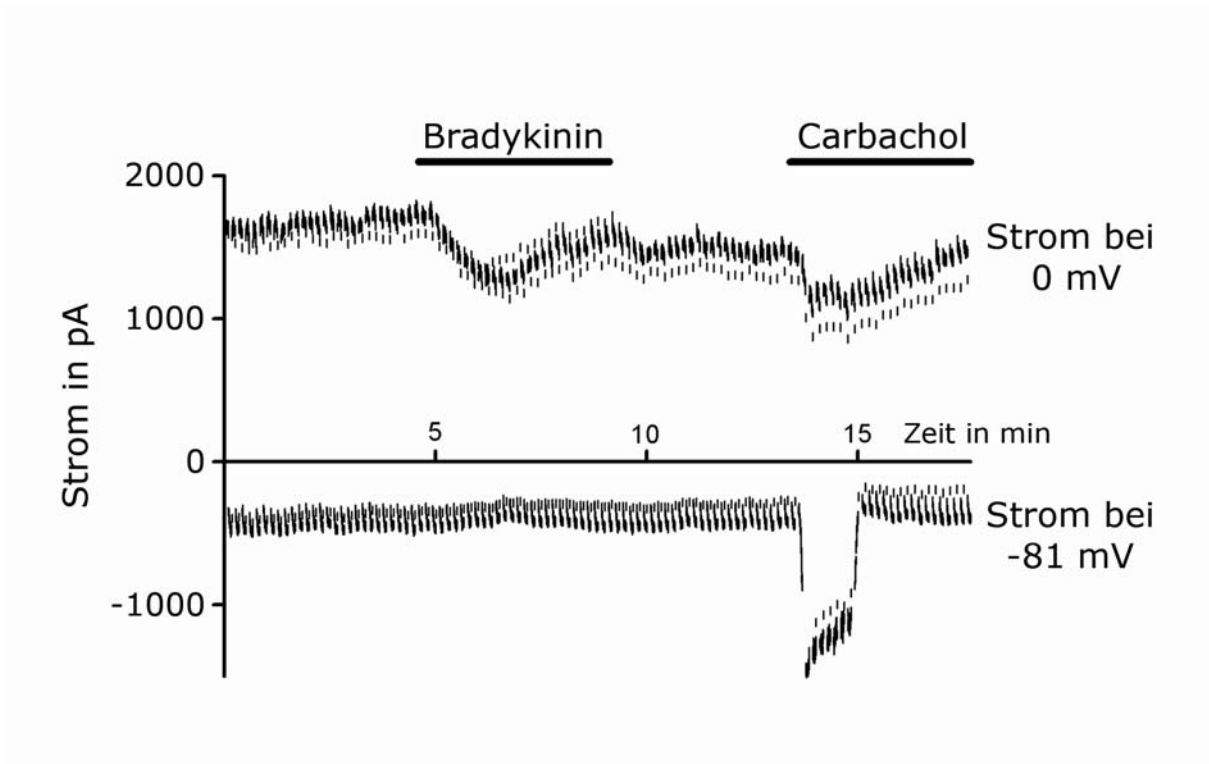


Abb. III-27: Original-Verlauf der Strommessung bei den Haltepotentialen 0 mV und -81 mV

Obere Kurve: Der bei 0 mV fließende Strom, der hauptsächlich einem K^+ -Ausstrom entspricht, wurde in Gegenwart von Bradykinin ($10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; linker schwarzer Balken) deutlich reduziert.

Untere Kurve: Der Strom bei -81 mV, der vor allem einem Na^+ -Einstrom entspricht, blieb während der Superfusion von Bradykinin unverändert. **Obere und untere Kurve:** Carbachol ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; rechter schwarzer Balken) wurde als Vitalitätskontrolle eingesetzt und veränderte die bei beiden Haltepotentialen fließenden Ströme.

IV Diskussion

1 Basale Charakterisierung des Plexus submucosus aus dem Colon der Ratte

Der Plexus submucosus bildet zusammen mit dem Plexus myentericus das enterische Nervensystem (ENS), welches neben dem Sympathikus und dem Parasympathikus eine eigene Untergruppe des vegetativen Nervensystems darstellt. Die beiden Plexus des ENS kontrollieren praktisch alle Aufgaben des Gastrointestinaltrakts und besitzen dabei die Fähigkeit autonom zu arbeiten (Bayliss & Starling 1899). Um jedoch die Verdauungsvorgänge mit den Bedürfnissen des Organismus abzustimmen, findet eine Interaktion mit dem zentralen Nervensystem (ZNS) statt (Cooke 1989), wobei sensorische afferente Nervenbahnen Informationen über die Abläufe im Verdauungssystem an das Gehirn leiten und umgekehrt steuernde oder modulierende Signale über efferente Nervenbahnen zurückgesendet werden.

Das enterale Nervensystem setzt sich aus drei funktionellen Komponenten zusammen: dem sensorischen Input, den verschaltenden Interneuronen und dem motorischen Output. Demnach werden die Nervenzellen je nach ihrer Funktion in sensorische Neurone, Interneurone und Motoneurone unterteilt (Wood 1994). Sensorische Neurone können mit Hilfe von Mechano-, Nozi-, Chemo- oder Osmosensoren Stimuli aus dem Darminneren registrieren und an Interneurone weiterleiten. Diese verarbeiten und modulieren den sensorischen Input und senden Aktionspotentiale an den motorischen Output, die Motoneurone, die entweder aktivierend (exzitatorisch) oder hemmend (inhibitorisch) auf ihre Zielgewebe wirken können. Zu den Zielgeweben gehören glatte Muskelzellen, das Epithel der Darmschleimhaut, Blutgefäße und auch enteroendokrine und immunkompetente Zellen. Die Motoneurone werden daher je nach der Struktur, die sie innervieren, unterteilt in Muskel-, Sekret- und Vasomotoneurone (Costa et al. 2000). Ein Beispiel für Sekretomotoneurone sind Nervenzellen im Plexus submucosus, deren Axone bis zu den Epithelzellen der Mucosa reichen, wo sie die Sekretion stimulieren (Cooke 1989).

In welchen Anteilen die verschiedenen Neuronentypen auftreten, ist abhängig von den zu bewältigenden Aufgaben. So zählt ein großer Teil der Neurone des Plexus myentericus, dessen Hauptaufgabe in der Steuerung der Darmmotilität liegt, zu den Muskelmotoneuronen.

Innerhalb des Plexus submucosus, der hauptsächlich die Mucosafunktion reguliert, sind sehr viele Sekretomotoneurone lokalisiert, aber auch primär afferente Neurone mit sensorischen Funktionen und Motoneurone, die die lokale Durchblutung steuern (Bornstein & Furness 1988).

1.1 Klassifizierung enterischer Neurone

Neben der Einteilung nach der Funktion können enterische Neurone auch morphologisch unterschieden werden. Der früheste Versuch einer solchen morphologischen Klassifizierung wurde von dem Neuroanatomen Dogiel durchgeführt (Dogiel 1899). Die von ihm beschriebene Einteilung in drei Zelltypen ist bis heute gültig. Dogiel Typ I Neurone haben einen ovalen Zellkörper, einen langen Fortsatz, der das Axon darstellt, und mehrere kurze lamellenartige Dendriten, mit denen Signale von anderen Neuronen empfangen werden können (Wood 1994). Das lange Axon ermöglicht es diesen Nervenzellen bis in relativ weit entfernte Strukturen zu projizieren. Dogiel Typ II Neurone sind oft kugelförmig, haben eine glatte Oberfläche und besitzen mehrere lange Fortsätze, die in Varikositäten enden und von denen keiner klar als Axon ausgemacht werden kann (Wood 1994). Der dritte Typ ist dem Typ II ähnlich, besitzt aber mehrere und kürzere Fortsätze. Es wird vermutet, dass Nervenzellen des Dogiel Typ I Moto- oder Interneurone sind, während Neurone des Typ II den sensorischen Neuronen zugeordnet werden.

Immunhistochemische Untersuchungen meiner Arbeit am intakten Häutchenpräparat des Plexus submucosus der Ratte zeigten, dass sich die einzelnen Neurone im Gefüge des Ganglienverbands befinden, innerhalb dem sie dicht nebeneinander liegen und von Gliazellen umgeben sind (Abb. III-2). Durch diese Zellanordnung war es nicht möglich, die Nervenzellen nach den oben beschriebenen Kriterien morphologisch zu identifizieren. In der primären Zellkultur jedoch, in der die einzelnen Neurone isoliert kultiviert wurden, waren Form und Fortsätze bereits lichtmikroskopisch erkennbar und nach immunocytochemischer Färbung sehr deutlich sichtbar. Einige Neurone bildeten nur einen langen Fortsatz, weshalb sie möglicherweise dem Dogiel Typ I zugeordnet werden können (Abb. IV-1A), andere besaßen viele und zum Teil lange Ausläufer, von denen keines als Axon ausgemacht werden konnte, die also eventuell dem Dogiel Typ II entsprechen (Abb. IV-1B). Da das Vorhandensein von Ausläufern und auch deren Form und Länge abhängig von der

Kultivierungsdauer und damit dem Wachstumsgrad waren, konnte auf keine zuverlässige Unterscheidung und damit auch keine Quantifizierung der verschiedenen Neuronentypen vorgenommen werden.

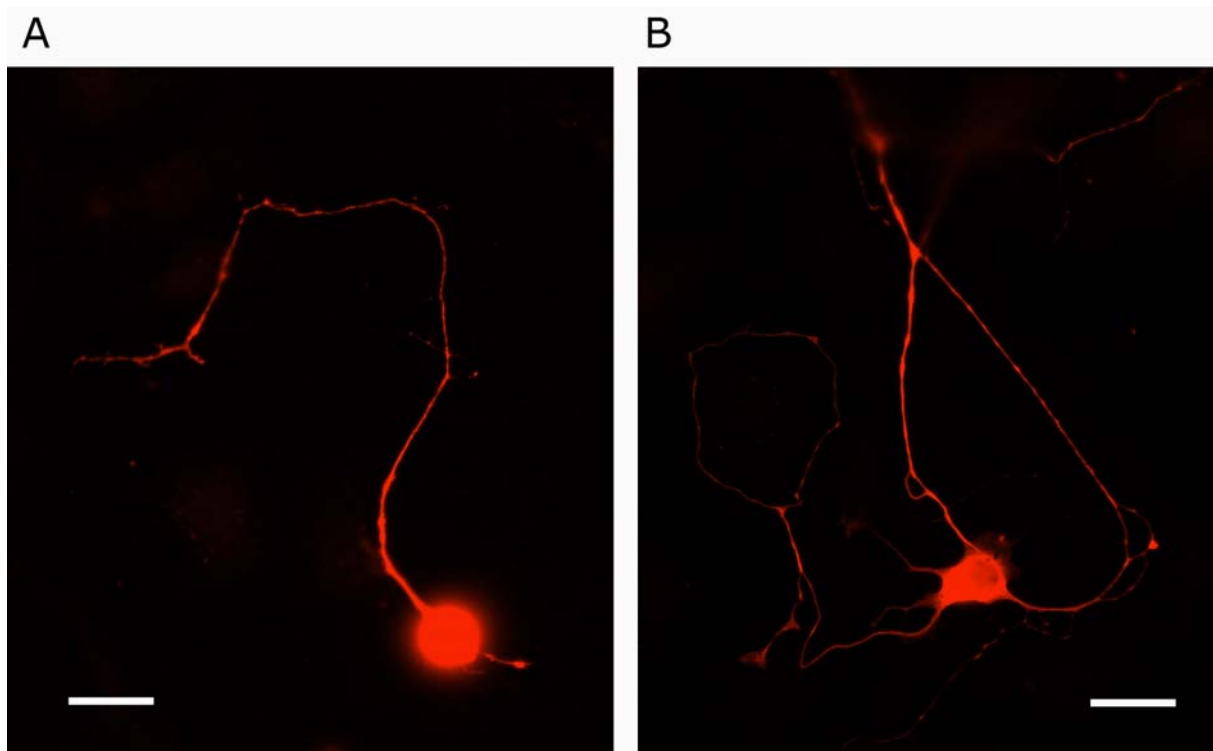


Abb. IV-1: Immuncytochemische Darstellung unterschiedlicher Neuronentypen

Isolierte submucöse Neurone können morphologisch in Dogiel Typ I Neurone mit einem langen Fortsatz, der das Axon darstellt (**A**), oder Dogiel Typ II Neurone mit mehreren langen Fortsätzen (**B**) unterteilt werden. Eichbalken 20 μm

Neben dieser morphologischen Klassifizierung gibt es auch die Möglichkeit, enterische Nervenzellen anhand ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften zu unterteilen. Die wichtigste Unterscheidung erfolgt in S- und AH-Neurone. Bei S-Neuronen erfolgt die Ausbildung des Aktionspotentials durch den Einstrom von Na^+ -Ionen, während bei AH-Neuronen auch Ca^{2+} -Ionen beteiligt sind. Praktisch lassen sich die zwei Neuronentypen mit dem Na^+ -Kanal-blockierenden Gift Tetrodotoxin unterscheiden, welches nur die Aktionspotentiale von S-Neuronen komplett unterdrückt. Weitere Unterscheidungsmerkmale sind, dass S-Neurone meist ein weniger negatives Membranpotential als AH-Neurone haben und letztere nach einem Aktionspotential eine charakteristische Nach-Hyperpolarisation (After-Hyperpolarisation, abgekürzt AH) ausbilden. Erzeugt wird dieser Effekt durch Öffnung

von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen, die einen Ausstrom der positiv geladenen K^+ -Ionen aus der Zelle vermitteln (Wood 1994).

Vermutlich sind Interneurone und Motoneurone, die morphologisch dem Dogiel Typ I zugeordnet werden, elektrophysiologisch gesehen S-Neurone, während AH-Neurone, die dem Dogiel Typ II zugeordnet werden, sensorische, primär afferente Neurone sind (Furness et al. 1989a). Diese Einteilung ist jedoch zum Teil umstritten, da z.B. nicht alle AH-Neurone die morphologische Erscheinung eines Dogiel Typ II Neurons aufweisen.

Eine dritte Möglichkeit zur Unterscheidung der Nervenzellen ist die neurochemische Charakterisierung. Sie basiert auf dem Nachweis von neuronal hergestellten Transmittern, von denen im ENS ca. 25 verschiedene bekannt sind. Üblicherweise synthetisieren die Neurone eine Kombination aus einem primären und mehreren colokalisierten sekundären Transmittern oder Neuromodulatoren (Furness et al. 1995). Anhand dieser Colokalisation entsteht eine bestimmte Transmitter-Kombination, die auch als "neurochemischer Code" einer Nervenzelle bezeichnet wird und anhand dessen sich verschiedene Neuronen-Subpopulationen unterscheiden lassen (Furness et al. 1989b). Das chemische Coding ist bislang nur bei Meerschweinchen gut untersucht. Dort sind fünf Klassen submucöser Neurone bekannt. Im Plexus submucosus der Ratte kommt in fast allen Nervenzellen Acetylcholin als Transmitter vor, der gleichzeitig auch von Vasointestinalem Peptid (VIP) oder Neuropeptid Y begleitet sein kann (Mann et al. 1999, Ekblad et al. 1988). Die Kodierungen der verschiedenen Subpopulationen sind mit spezifischen Funktionen innerhalb des Gastrointestinaltrakts korreliert (Furness et al. 1995). Um vom neurochemischen Code einer Subpopulation auf ihre Funktion schließen zu können, muss aber neben der Wirkung der Transmitter auch das innervierte Zielgewebe bekannt sein. Ein Nachteil der neurochemischen Einteilungsmethode besteht in der großen Divergenz, die bereits zwischen nahe verwandten Tierarten wie Ratte, Maus und Meerschweinchen besteht und der darin begründeten begrenzten Übertragbarkeit auf den Menschen.

1.2 Transmitter des enterischen Nervensystems

Alle aus dem ZNS bekannten Neurotransmitter bzw. Neuromodulatoren kommen auch innerhalb des ENS vor (Gershon et al. 1994). Neben diesen klassischen Transmittern verfügen Nervenzellen des Darms zusätzlich über nonadrenerge, non-cholinerge (NANC) Überträgerstoffe unterschiedlichster Substanzklassen, wie z.B. Amine, Aminosäuren, Peptide, Purine,

endogene Opioide oder Gasotransmitter. Das in inhibitorischen Motoneuronen vorkommende NO, das auf die glatte Muskulatur hemmend wirkt, ist eine solche gasförmige Substanz (Sanders & Ward 1992, Bornstein et al. 2004). Zusammen mit dem in exzitatorischen Motoneuronen vorkommenden Acetylcholin gehört NO zu den wichtigsten Transmittern im Gastrointestinaltrakt. Acetylcholin spielt insbesondere auch bei der Regulation des mucosalen Ionentransports eine wichtige Rolle (Diener et al. 1989b). Im Darm der Ratte sind nahezu alle submucösen Neurone cholinerg (Mann et al. 1999, Ekblad et al. 1988).

In meiner Arbeit wurde die Wirkung von Carbachol, einem stabilen Derivat von Acetylcholin, auf submucöse Neurone der Ratte untersucht. Die dazu durchgeführten Experimente zeigten, dass in diesem Zelltyp sowohl nicotinerge als auch muskarinerge Rezeptoren vorkommen. Nicotinerge Rezeptoren (N-Rezeptoren) sind zylindrische transmembranäre Ionenkanäle, die sich aus fünf Untereinheiten zusammensetzen (Hogg et al. 2003). Nach Bindung des Liganden kommt es zu einer Öffnung des Kanals und dadurch zu einem Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen, der von einem K^+ -Ausstrom begleitet ist. Neben Acetylcholin ist das pflanzliche Nicotin ein Agonist des N-Rezeptors. Die quartäre Ammoniumverbindung Hexamethonium wirkt hingegen antagonistisch und wurde in meiner Arbeit als N-Rezeptor-Blocker verwendet. Muskarinerge Rezeptoren (M-Rezeptoren) sind G-Protein-gekoppelt, d.h. sie vermitteln Signale indirekt über second messenger. Namensgeber dieser Rezeptoren ist das agonistisch wirkende Pilzgift Muskarin. Der M-Rezeptor stößt nach Bindung des Agonisten eine Signalkaskade an, die im Fall der Subtypen M1, M3 und M5 zu einer Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) vermittelten Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt (Diener et al. 1989b). Als Antagonist des M-Rezeptors wurde das aus Tollkirschen (Atropa) gewonnene Atropin verwendet. Die Antagonisten-Versuche ergaben zudem, dass Carbachol in allen getesteten submucösen Neuronen einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration hervorrief. Aufgrund dieser aktivierenden Wirkung wurde Carbachol in den folgenden Versuchen als Vitalitätskontrolle eingesetzt.

1.3 Gliazellen

Enterische Gliazellen entsprechen am ehesten Astrocyten des ZNS, beide exprimieren das immunhistochemisch gut nachweisbare glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Rühl 2005). Eine gliale Schicht, die aus Schwann-Zellen besteht, hüllt die enterischen Nervenzellen ein, stellt aber kein Hindernis für Makromoleküle dar, da sie immer wieder unterbrochen ist,

wodurch Axonenden und sogar Ganglienzellen herausragen können (Gershon & Bursztajn 1978). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Doppelmarkierungen des intakten submucösen Häutchenpräparats zeigten, dass sich die Ganglien sowohl aus Neuronen als auch aus Gliazellen zusammensetzen (Abb. III-2). Dabei war jedes einzelne Neuron innerhalb des Ganglions von glialem Gewebe umgeben. An den isolierten submucösen Zellen der Primärkultur, bei denen der physiologische Ganglienverband nicht mehr vorhanden war, konnte beobachtet werden, dass die neuronalen Fortsätze Kontakt zur Zelloberfläche von benachbarten Gliazellen herstellten (Abb. III-22B). Dadurch konnte vermutlich auch in der Kultur wieder eine Interaktion zwischen den Zelltypen stattfinden.

Physiologisch haben Gliazellen gegenüber Neuronen eine stützende und ernährende Funktion, sorgen zudem für elektrische Isolation der Axone durch Ausbildung einer Myelinschicht und besitzen die Fähigkeit, aus Neuronen freigesetzte Ionen, besonders K^+ , aufzufangen und so kurzzeitige Konzentrationsspitzen abzuf puffern. Obwohl Gliazellen keine Aktionspotentiale ausbilden können, sind sie dennoch bei der Regulation neuronaler Prozesse von großer Bedeutung (Übersicht bei Ransom & Sontheimer 1992).

Welche Rolle Gliazellen im enteralen Nervengewebe genau spielen, ist noch nicht gut verstanden. Bekannt ist jedoch, dass sie beim Erhalt der Darmhomöostase, der Darmintegrität und der Modulation von Entzündungsreaktionen sehr wichtig sind. Zum Beispiel führt eine beeinträchtigte Funktion der Gliazellen im Tiermodell zu einer schweren Darmentzündung (Bush et al. 1998, Cornet et al. 2001). Ebenso ist bekannt, dass Gliazellen genau wie Neurone Rezeptoren für Transmitter oder andere Signalstoffe besitzen. Im Plexus myentericus der Ratte exprimieren Gliazellen beispielsweise den Bradykinin B2-Rezeptor und können auf den Entzündungsmediator Bradykinin reagieren, indem sie Prostaglandine ausschütten, die sekundär zu einer Aktivierung von Neuronen führt (Murakami et al. 2007). Andere Beispiele für gliale Zielstrukturen der Bradykinin-Wirkung sind Astrozyten der Ratte. Hier löst Bradykinin eine B2-Rezeptor-vermittelte Ausschüttung von Glutamat aus, welche einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in den umliegenden Neuronen erzeugt (Papura et al. 1994). Auch in verschiedenen Bereichen innerhalb des Gehirns konnte ein glialer Bradykinin B2-Rezeptor nachgewiesen werden (Chen et al. 2000).

Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben allerdings, dass der Bradykinin B2-Rezeptor in Gliazellen des Plexus submucosus der Ratte nicht vorhanden ist. Doppelfärbungen von Gliazellen und Bradykinin B2-Rezeptoren zeigten, dass dies sowohl für das intakte submucöse Häutchenpräparat, als auch für die isolierten kultivierten Zellen zutrifft

(Abb. III-11, 24). Das Fehlen der glialen Bradykinin B2-Rezeptoren deutet darauf hin, dass Gliazellen in diesem Teil des ENS nicht an der Bradykinin-Antwort beteiligt sind.

2 Bradykinin

2.1 Entdeckung von Bradykinin

Die Wirkung von Bradykinin und anderen Kininen wurde bereits im Jahr 1909 beobachtet, als durch Injektion von Urinbestandteilen ein Abfall des Blutdrucks bei menschlichen Probanden festgestellt wurde. Erst fast 20 Jahre später, nachdem dieser hypotensive Effekt an Hunden genauer untersucht wurde, postulierten Frey und Kraut (1926), dass es sich bei der auslösenden Substanz um ein Hormon handelt, welches die Blutgefäße beeinflusst und nannten es zunächst Kreislaufhormon oder F-Substanz. Kurz darauf wurde diese Substanz in Kallikrein umbenannt, da sie im Pankreas (griechisch: Kallikreas) in sehr hohen Mengen vorkommt (Kraut et al. 1930). Rocha e Silva erkannte 1949, dass es sich bei der Substanz um ein Peptid handelt und beobachtete zudem die kontraktionsauslösende Wirkung auf den Darm von Meerschweinchen. Abgeleitet von den griechischen Wörtern „Bradys“ für langsam und „Kinesia“ für Bewegung nannte er dieses Peptid Bradykinin (Rocha e Silva et al. 1949). Nach weiteren elf Jahren wurde die Aminosäure-Sequenz des Nonapeptids Bradykinin entschlüsselt: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (Boissonnas et al. 1960). In den darauf folgenden Jahren fanden verstärkt Untersuchungen zur physiologischen Wirkung statt.

2.2 Wirkung von Bradykinin

Bradykinin ist ein bekannter Mediator von Entzündungen. Erstmals wurde 1964 beschrieben, dass dieses Kinin alle Kardinalsymptome einer Entzündung wie Schwellung, Rötung, lokale Erwärmung und Schmerz erzeugen kann (Lewis 1964). Dabei kann Bradykinin direkt schmerzleitende Nervenfasern aktivieren und auch die nociceptiven Neurone gegenüber anderen physikalischen oder chemischen Reizen sensitivieren, indem es die Zellmembran depolarisiert (Farmer 1997). Weiterhin ist Bradykinin an vielen

physiologischen sowie pathophysiologischen Vorgängen im gesamten Organismus beteiligt, zu denen die Regulation des Blutdrucks und der Gefäßpermeabilität, die Kontraktion der glatten Muskulatur, Schmerzreaktionen, Asthma, Arthritis oder Sepsis gehören (Bhoola et al. 1992). Das Kinin beeinflusst zudem das Zellwachstum, die Expression von bestimmten proinflammatorischen Genen und es spielt sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem eine Rolle als Neuromodulator (eine Übersicht findet sich bei Farmer 1997).

Die Wirkung von Bradykinin kann direkt über die entsprechenden Rezeptoren erfolgen oder indirekt durch Ausschüttung weiterer aktiver Substanzen wie z.B. NO, Prostaglandine oder Histamin. Durch den raschen enzymatischen Abbau von Bradykinin ist dessen Wirkung jedoch zeitlich sehr begrenzt. Die Plasma-Halbwertszeit liegt im Sekundenbereich (Bhoola et al. 1992). Beim Menschen übernehmen hauptsächlich das Angiotensin I-Converting Enzym (ACE), aber auch die Carboxypeptidasen N und M die Degradation von Bradykinin (Dendorfer et al. 2001). Bei der Ratte ist zusätzlich die Aminopeptidase P beteiligt (Ahmad & Ward 1992).

2.3 Bradykinin-Rezeptoren

Regoli und Barabé entdeckten 1980 zwei pharmakologisch verschiedene Bradykinin-Rezeptoren, den Bradykinin B1- und den B2-Rezeptor (Regoli & Barabé 1980). Beide sind an ein G-Protein gekoppelt und besitzen sieben transmembranäre Helices. Der Bradykinin B2-Rezeptor wird konstitutiv in gesundem Gewebe exprimiert und vermittelt die physiologische Wirkung von Bradykinin und Lys-Bradykinin (auch Kallidin genannt), kann aber auch an pathophysiologischen Prozessen beteiligt sein. Es wurde z.B. gezeigt, dass sich durch Blockierung des B2-Rezeptors mit dem Antagonisten HOE 140 die Symptome der Colitis ulcerosa reduzieren lassen (Arai et al. 1999). Die B2-Rezeptor-vermittelten Effekte dauern in der Regel nur kurz an, da die Agonisten sehr schnell abgebaut werden und auch der Rezeptor schnell desensitiviert, was durch Internalisation (Pizard et al. 1999) und/oder negative Kooperativität erfolgen kann (Pizard et al. 1998). Auch in den hier durchgeführten Versuchen beschränkte sich der Bradykinin-induzierte Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auf wenige Minuten (Abb. III-4). Um auszuschließen, dass die Dauer des Effekts durch die kurze Halbwertszeit des Kinins begrenzt war, erfolgte eine ständige Perfusion mit frischer Bradykinin-Lösung. Wurde Bradykinin nach einer Auswaschphase ein zweites Mal

zugegeben, konnte eine deutliche Reduktion des Ca^{2+} -Anstiegs beobachtet werden, was für eine Desensitivierung des B2-Rezeptors in diesem Gewebe spricht.

Der Bradykinin B1-Rezeptor ist dagegen nicht oder nur wenig in gesundem Gewebe vorhanden und wird erst nach Induktion durch Verletzungen oder Entzündungen in die Zellmembran eingebaut. In kultivierten myenterischen Neuronen kann man die Expression von Bradykinin B1-Rezeptoren durch Entzündungsmediatoren wie den Tumornekrosefaktor- α oder Interleukin-1 hervorrufen (Murakami et al. 2008). Passend zur verzögerten Expression des B1-Rezeptors erfolgt dessen Aktivierung durch die Agonisten des-Arg⁹-Bradykinin und Lys-des-Arg⁹-Bradykinin (= des Arg¹⁰-Kallidin), die erst in einem zweiten Schritt durch Abbau der oben genannten B2-Rezeptor-Agonisten hergestellt werden (Farmer 1992, Hess et al. 1994). Die des-Arg-Metaboliten sind langlebiger als Bradykinin oder Kallidin und stellen dadurch eine Möglichkeit dar, die Kinin-Effekte in entzündetem Gewebe über längere Zeit aufrechtzuerhalten. Zudem kann auch der B1-Rezeptor langandauernd aktiv sein, da er keine Internalisierung als Reaktion auf die Bindung eines Agonisten erfährt (Zhou et al. 2000). Vermutlich ist der B1-Rezeptor ausschließlich für die pathophysiologische Bradykinin-Wirkung verantwortlich und ist besonders an chronischen Entzündungen beteiligt.

Während dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Wirkung von Bradykinin auf Nervenzellen des Plexus submucosus aus dem Colon der Ratte untersucht. Immunhistochemische Markierungen wiesen den Bradykinin B2-Rezeptor in Neuronen des intakten Häutchenpräparats des Plexus submucosus und auch in isolierten kultivierten Neuronen nach (Abb. III-9, 23A). Hingegen war in beiden Präparaten kein Signal des B1-Rezeptors zu erkennen (Abb. III-10, 23B). Entsprechend der Annahme, dass B2-Rezeptoren in gesundem Gewebe vorkommen, B1-Rezeptoren jedoch nur in entzündetem, war dieses Ergebnis zu erwarten.

In Ca^{2+} -Imaging-Versuchen wurde der Effekt des Kinins auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration gemessen. Es zeigte sich, dass Bradykinin in den meisten Neuronen des intakten Häutchenpräparats des Plexus submucosus einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auslöste, also zu einer Aktivierung der Zellen führte (Abb. III-5). Die Ca^{2+} -Imaging-Versuche mit einem B2-Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten bestätigten die Präsenz und Funktionalität von Bradykinin B2-Rezeptoren in submucösen Neuronen (Abb. III-8). Zusätzliche Versuche mit einem B1-Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten zeigten, dass die Bradykinin-Effekte im submucösem Gewebe ausschließlich durch den Bradykinin B2-Rezeptor vermittelt werden und der B1-Rezeptor dabei keine Rolle spielt (Abb. III-6). Auch in Versuchen, die über 6 h nach der traumatischen Gewebepreparation stattfanden,

waren keine B1-Rezeptoren am Ca^{2+} -Anstieg beteiligt. Um herauszufinden, ob der B1-Rezeptor in diesem Gewebe von Bedeutung ist, das heißt, ob er überhaupt induziert werden kann, wären Experimente mit Gewebe, das z.B. über längere Zeit dem Entzündungsmediator Interleukin ausgesetzt war, hilfreich, in denen statt Bradykinin ein spezifischer B1-Rezeptor-Agonist verwendet wird. Zwar kommt es im Gewebe sehr schnell zum Abbau von Bradykinin zu einem B1-Rezeptor-Agonisten, jedoch wäre es möglich, dass dieser während der durchgeführten Versuche durch die Perfusion zu schnell wieder weggespült wurde.

3 Einfluss von Bradykinin auf die Cl^- -Sekretion am Darmepithel

Ein Effekt von Bradykinin ist die verstärkte Sekretion von Cl^- ins Darmlumen, was sowohl neuronal als auch epithelial, jeweils über Bradykinin B2-Rezeptoren, vermittelt wird (Baird et al. 2008). Um während des gesteigerten Cl^- -Ausstroms eine gleich bleibende Osmolarität und einen elektrischen Ladungsausgleich aufrecht zu erhalten, geht dieser Ausstrom mit einer Na^+ - und H_2O -Bewegung einher (Übersicht bei Barret & Keely 2000), die eine sekretorische Diarrhoe zur Folge haben kann. Unter physiologischen Bedingungen ist die Sekretion von Flüssigkeit vernachlässigbar gering. In gesundem Gewebe besteht die Hauptaufgabe des Colons in der Resorption von Flüssigkeit. Pro Tag gelangen zwischen 1,3 und 1,8 Liter aus dem Dünndarm in das menschliche Colon, wo sie weitestgehend resorbiert werden, nur etwa 10 % der Flüssigkeit verbleibt im Dickdarm und wird mit den Fäzes ausgeschieden (Cooke 1991).

Während pathophysiologischen Zuständen, die z.B. durch Entzündungsreaktionen innerhalb der Darmwand ausgelöst werden, kann das empfindliche Gleichgewicht zwischen Sekretion und Resorption in Richtung einer gesteigerten Sekretion verschoben sein. Die Epithelzellen der Mucosa sezernieren dann vermehrt Cl^- -Ionen. Auch bei entzündlichen Darmerkrankungen wurde eine gesteigerte Cl^- -Sekretion beobachtet, die vermutlich durch Entzündungsmediatoren, wie das in dieser Arbeit untersuchte Bradykinin, ausgelöst werden (Devani et al. 2005). Die Vorgänge, die zu entzündlichen Darmerkrankungen führen, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden und auch eine zufriedenstellende Therapie fehlt bislang. Bradykinin-Rezeptor-Blocker übten im Tiermodell einen positiven Effekt auf die Symptome der ulcerativen Colitis aus (Arai et al. 1999).

3.1 Einfluss von Cyclooxygenase-Metaboliten auf den Bradykinin-Effekt

Aus der ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure können mit Hilfe sogenannter Cyclooxygenasen (COX) Prostaglandine gebildet werden. Prostaglandine sind unter anderem an Entzündungsprozessen, Schmerzreaktionen und der Fieberentstehung beteiligt. Außerdem können sie den Blutdruck und die glatte Muskulatur beeinflussen. Hemmstoffe der Prostaglandinsynthese sind z.B. die in Aspirin enthaltene Acetylsalicylsäure, aber auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Indomethacin. Durch Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 oder Bradykinin kann die Bildung von Prostaglandinen gesteigert werden. In vielen Zellen sind Bradykinin-Effekte sogar erst sekundär durch eine Ausschüttung der Prostaglandine vermittelt und somit durch COX-Hemmer unterdrückbar (Gelperin et al. 1994, Hu et al. 2004a, Hu et al. 2004b, Murakami et al. 2007, Murakami et al. 2008).

Während meiner Arbeit durchgeführte Experimente an einem Submucosa-Mucosa-Präparat aus dem Colon der Ratte zeigten, dass Bradykinin an der Mucosa eine gesteigerte Cl^- -Sekretion hervorrief, die durch Indomethacin reduziert werden konnte (Abb. III-13). Das weist auf eine Beteiligung von Prostaglandinen an diesem Prozess hin. Schon frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe an dem gleichen Gewebepreparat ergaben, dass Bradykinin die sezernierenden Zellen des Darmepithels durch Stimulation submucöser Sekretomotorneurone aktiviert und dass dieser Prozess durch Indomethacin hemmbar ist (Diener et al. 1988a). Diese Daten führten zur Hypothese, dass die Effekte von Bradykinin in diesem Gewebe durch neuronal wirkende Prostaglandine vermittelt werden (Diener et al. 1988b). Die in meiner Arbeit direkt an submucösen Neuronen gewonnenen Ergebnisse zeigten jedoch, dass der Bradykinin-Effekt durch Indomethacin nicht gehemmt werden konnte (Abb. III-12), was bedeutet, dass die neuronale Wirkung von Bradykinin nicht durch Prostaglandine vermittelt sein kann.

Zusammengefasst ergeben die aus früheren Studien und die aus meiner Arbeit gewonnenen Daten, dass die Bradykinin-induzierte Cl^- -Sekretion ausgelöst wird durch die Wirkung von Bradykinin auf submucöse Neurone, die daraufhin Signale an die Epithelzellen der Mucosa senden und diese so zur Cl^- -Sekretion anregen (Abb. IV-4). Der erste Schritt, nämlich die neuronale Wirkung von Bradykinin, ist nicht Indomethacin-sensitiv, während der zweite, an den mucosalen Zellen stattfindende Schritt dagegen durch Indomethacin gehemmt wird, was für eine Prostaglandin-Beteiligung in diesen Zellen spricht. Aufgrund dieser Ergebnisse

wurde die Rolle der Prostaglandine während der Anionen-Sekretion am Darmepithel an Submucosa-Mucosa-Präparaten genauer untersucht.

Man weiß, dass die meisten Prostaglandine nach Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor intrazellulär die Konzentration von cAMP erhöhen und dass die Prostaglandin-Effekte oftmals durch diesen Signalstoff vermittelt werden (Coleman et al. 1994). Die Eigenschaft der Prostaglandine, einen Anstieg der cAMP-Konzentration auszulösen, wurde in den folgenden Versuchen durch Forskolin, einen Aktivator der cAMP-synthetisierenden Adenylatcyclase(n), imitiert. In dieser Versuchsanordnung war Indomethacin nicht mehr in der Lage, die durch Bradykinin ausgelöste Sekretion zu hemmen (Abb. III-13). Dieses Ergebnis belegt, dass die neuronal vermittelte Wirkung von Bradykinin auf die Anionen-Sekretion am Darmepithel auf Ebene der mucosalen Epithelzellen nicht durch eine Bradykinin-induzierte Ausschüttung von Prostaglandinen vermittelt wird, sondern lediglich abhängig ist von der Gegenwart an physiologisch hergestellten Prostaglandinen, die die cAMP-Konzentration in den Epithelzellen erhöhen. Das cyclische Monophosphat cAMP ist notwendig, um Cl⁻-Kanäle der apikalen Membran, die CFTR-Kanäle, durch Phosphorylierung in einem Zustand hoher Offenwahrscheinlichkeit zu halten, da das für diesen Vorgang benötigte Enzym, die Proteinkinase A, cAMP-abhängig ist (Greger 2000).

Dies bedeutet, dass der Effekt von Bradykinin auf die Cl⁻-Sekretion am Colonepithel zwar abhängig ist von einer ausreichenden cAMP-Konzentration, die physiologisch durch Prostaglandine aufrecht erhalten wird, nicht aber durch Prostaglandine vermittelt wird. Eine ähnliche Situation wurde auch bei serosalen afferenten Nerven aus dem Dünndarm der Ratte gefunden. Dort konnte die zuvor durch einen COX-Hemmer reduzierte Bradykinin-Antwort durch Gabe des Prostaglandins E₂ wiederhergestellt werden (Maubach & Grundy 1999). Daraus lässt sich schließen, dass eine Indomethacin-sensitive Bradykinin-Reaktion nicht automatisch bedeuten muss, dass die Wirkung von Bradykinin sekundär durch eine vermehrte Ausschüttung von Prostaglandinen vermittelt wird, sondern lediglich von deren Anwesenheit abhängig ist.

4 Ca^{2+} als intrazellulärer Botenstoff

Ca^{2+} -Ionen fungieren als second messenger, die als Reaktion auf einen Stimulus viele verschiedene Prozesse innerhalb der Zelle steuern. Um diese Aufgaben erfüllen zu können, ist es wichtig, dass die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration im Ruhezustand der Zelle möglichst gering gehalten wird. In unerregten Neuronen beträgt sie ca. 100 nM (Bootman et al. 2001). Im umgebenden extrazellulären Raum ist die Ca^{2+} -Konzentration etwa 25.000 Mal so hoch wie im Cytosol. Um diesen Gradienten aufrecht zu erhalten, wird Ca^{2+} zum einen intrazellulär im endoplasmatischen Reticulum (ER) und den Mitochondrien gespeichert und zum anderen in den Extrazellularraum hinaus transportiert. Die ATP-abhängige Ca^{2+} -Pumpe SERCA (Sarco-Endoplasmatisches Reticulum- Ca^{2+} -ATPase) befördert Ca^{2+} -Ionen aus dem Cytosol entgegen dem Konzentrationsgefälle ins ER hinein. Eine andere ATP-abhängige Pumpe, die PMCA (Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase), arbeitet ebenfalls gegen den Konzentrationsgradienten, transportiert Ca^{2+} allerdings heraus in den extrazellulären Raum (Berridge 1997). Zusätzlich schleust ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher Ca^{2+} -Ionen aus der Zelle hinaus (Blaustein & Lederer 1999).

Kommt es durch die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor zur Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen, können angetrieben durch das große Konzentrationsgefälle in kurzer Zeit sehr viele Ca^{2+} -Ionen ins Zellinnere strömen und dort zu einer relativ starken Erhöhung der cytosolischen Konzentration auf 1 μM oder mehr führen (Bootman et al. 2001), was mit einer gesteigerten Erregbarkeit einhergeht. Weiterhin kann eine erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Konzentration verschiedene Signaltransduktionskaskaden anstoßen, die unter anderem Prozesse wie die Ausschüttung von Neurotransmittern, Enzymaktivierung, Genexpression, Steuerung von Stoffwechselvorgängen und Regulation von anderen Ionenkanälen kontrollieren. Entgegen den aktivierenden Effekten von Ca^{2+} ist es auch möglich, dass es durch Bindung von Ca^{2+} an Ionenkanäle zu einer veränderten Leitfähigkeit dieser Kanäle und so zu einer Hyperpolarisation und damit zu einer verminderten neuronalen Erregbarkeit kommt.

5 Intrazelluläre Vermittlung der Wirkung von Bradykinin auf submucöse Neurone

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Ionenkanäle bzw. Ionenströme an der intrazellulären Antwort auf Bradykinin in submucösen Neuronen der Ratte beteiligt sind. Dazu wurde überprüft, ob IP₃- und Ryanodin-Rezeptoren, die zu den intrazellulären ligandengesteuerten Ca²⁺-Kanälen gehören, oder spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle in der Plasmamembran an dem Bradykinin-induzierten Anstieg der Ca²⁺-Konzentration beteiligt sind. Weiterhin wurde der Effekt von Bradykinin auf das Membranpotential und die zellulären Ionenströme gemessen.

5.1 Fehlende Beteiligung des PLC-IP₃-Ca²⁺-Signalwegs

Der IP₃- wie auch der Ryanodin-Rezeptor sind beide innerhalb der Membran des Ca²⁺-speichernden ERs lokalisiert und vermitteln nach Bindung eines Agonisten den Ausstrom von Ca²⁺ in das Cytosol der Zelle (Berridge 2002). Der Ryanodin-Rezeptor ist an der Ca²⁺-induzierten Ca²⁺-Ausschüttung (CICR), die kleine Erhöhungen der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration massiv verstärken kann, beteiligt (Endo 2009). Neben Ca²⁺ kann auch das pflanzliche Alkaloid Ryanodin diesen Kanal aktivieren, oder - in höheren Konzentrationen - auch hemmen (Meissner 1986). Der IP₃-Rezeptor wird, wie der Name vermuten lässt, durch Inositol-1,4,5-trisphosphat, abgekürzt IP₃, aktiviert, das während des sogenannten PLC-IP₃-Ca²⁺-Signalwegs hergestellt wird. Dieser Signalweg wird durch die Bindung eines Agonisten an bestimmte Rezeptoren, die intrazellulär an ein G_q-Protein gekoppelt sind, angestoßen. Das G_q-Protein aktiviert daraufhin ein Enzym, die Phospholipase C (PLC), die durch Spaltung von Phospholipiden die Produkte IP₃ und Diacylglycerin (DAG) herstellt.

Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen aus Versuchen an anderen Tierarten oder Geweben, wird deutlich, dass die durch Bradykinin ausgelösten Signaltransduktionskaskaden eine große Variabilität aufweisen, deren Effekte sowohl hemmend als auch aktivierend auf die betroffene Zelle sein können. In manchen erregbaren Zellen wirkt Bradykinin durch Bindung an Bradykinin-Rezeptoren, die an ein G_{q/13}- oder G_i-

Protein gekoppelt sind, hemmend (Wilk-Blaszczak et al. 1994). In myenterischen Neuronen des Meerschweinchens, in DRG-Neuronen (dorsal root ganglia) der Ratte und in glatten Muskelzellen des Dünndarms von Meerschweinchen wurde beobachtet, dass Bradykinin zu einer Schließung von Ca_v -Kanälen führt und somit einen hemmenden Effekt auf diese Zellen ausübt (Bleakman et al. 1990, Beech 1993). In dem während meiner Arbeit untersuchten Gewebe war die Wirkung von Bradykinin aufgrund der Depolarisation und des Anstiegs der Ca^{2+} -Konzentration eine aktivierende.

Im Plexus submucosus von Meerschweinchen und auch in sensorischen Neuronen der Ratte wird der Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Anstieg durch die oben beschriebene Phospholipase C-vermittelte IP_3 -Bildung mit anschließender Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem ER ausgelöst (Hu et al. 2004b, Burgess et al. 1989). Um herauszufinden, ob sich dieser Signalweg auch an den Bradykinin B2-Rezeptor submucöser Neurone des Colons der Ratte anschließt, wurden in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Experimenten das G_q -Protein, die PLC und der IP_3 -Rezeptor inhibiert. Die Ergebnisse der Experimente mit dem spezifischen Inhibitor des G_q -Proteins, YM-254890 (Takasaki et al. 2004), zeigten, dass Bradykinin in diesem Gewebe an einen Bradykinin B2-Rezeptor bindet, der an das $\text{G}_{q/11}$ -Protein gekoppelt ist (Abb. III-14). Die Hemmung der PLC und des Ryanodin-Rezeptors konnten den Bradykinin-Effekt nicht beeinflussen (Abb. III-15,16B), was gegen eine Beteiligung dieses Enzyms bzw. Rezeptors am Prozess des Ca^{2+} -Anstiegs spricht. Nur durch Inhibition des IP_3 -Rezeptors mit Xestospongin C war die Zahl der auf Bradykinin reagierenden Neurone gegenüber der Kontrolle leicht - aber signifikant - verringert, wobei gleichzeitig der durch Bradykinin ausgelöste Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bei den reagierenden Zellen aus unbekannten Gründen signifikant erhöht war (Abb. III-16A). Diese unerwartete Reaktion könnte in unspezifischen Wirkungen von Xestospongin C begründet sein. Es wurde z.B. berichtet, dass neben der hemmenden Wirkung auf den IP_3 -Rezeptor außerdem Ca_v -Kanäle und spannungsabhängige K^+ -Kanäle inhibiert werden (Ozaki et al. 2002). Aufgrund des widersprüchlichen Ergebnisses einer verringerten Anzahl an Respondern bei einem erhöhten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration und der Tatsache, dass die Hemmung der PLC, also des Enzyms, das den Liganden des IP_3 -Rezeptors herstellt, keinen Effekt hatte, sollten die mit diesem Blocker erhaltenen Daten sehr vorsichtig bewertet werden.

Zusammenfassend lässt sich daher folgern, dass die Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Alle oben beschriebenen Untersuchungen des Bradykinin-Signalwegs sind in Abb. IV-2 dargestellt.

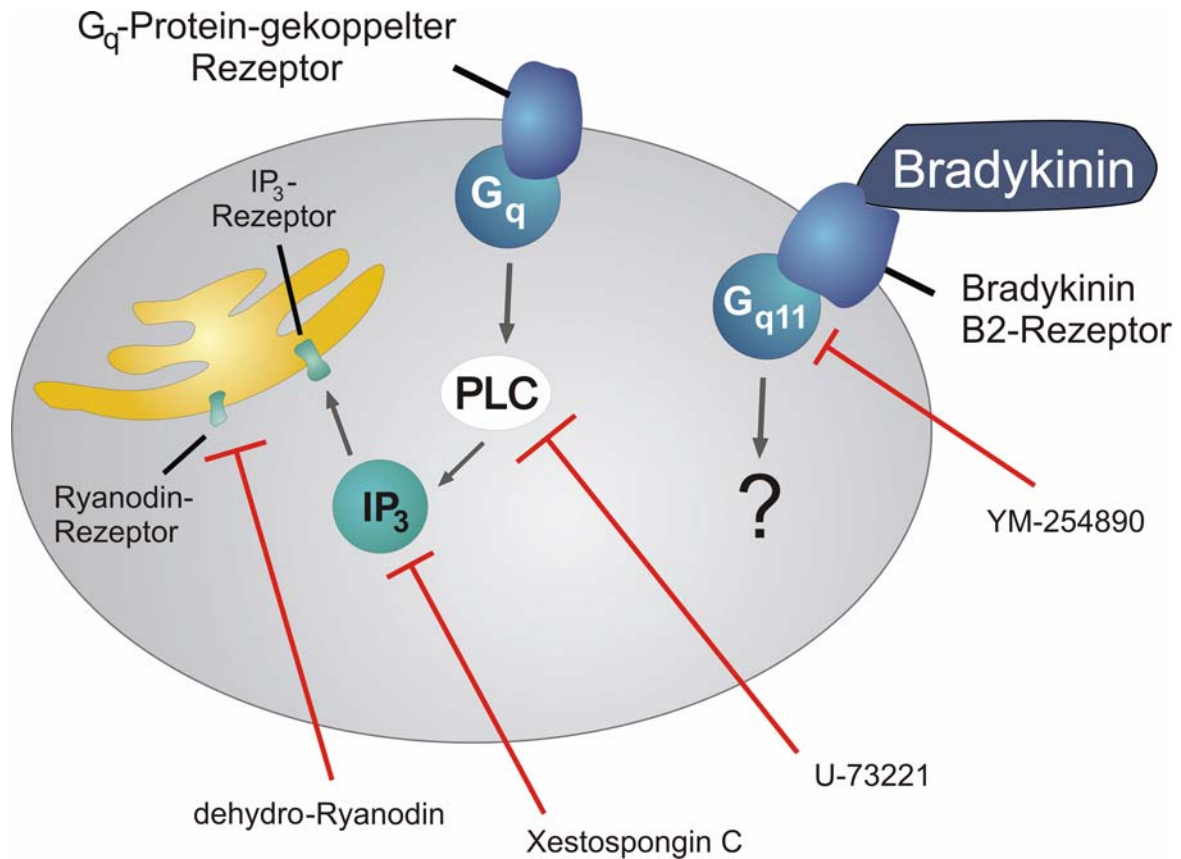


Abb. IV-2: Zusammenfassende Darstellung der Angriffsorte der eingesetzten Inhibitoren

Bradykinin bindet an einen Bradykinin B2-Rezeptor, der an ein G_{q11}-Protein gekoppelt ist. In vielen Zellen löst das G_q-Protein eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) aus. In der Folge kommt es während der üblicherweise durch das G_{q11}-Protein angestoßenen Kaskade zu einer IP₃-Herstellung mit anschließendem IP₃-Rezeptor-vermittelten Ausstrom von Ca²⁺ aus dem ER. In submucösen Neuronen der Ratte spielt die PLC bei der Bradykinin-induzierten Ca²⁺-Erhöhung allerdings keine Rolle. Auch ein IP₃-Rezeptor-vermittelter Ca²⁺-Ausstrom scheint im untersuchten Gewebe, wenn überhaupt, nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Der Ryanodin-Rezeptor spielt während des Bradykinin-induzierten Anstiegs der Ca²⁺-Konzentration ebenfalls keine Rolle.

5.2 Beteiligung von Ca_v -Kanälen

Bradykinin löst in submucösen Neuronen einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration aus, der nicht durch Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern erfolgt, dagegen aber stark von der Anwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} abhängig ist, wie Versuche in Ca^{2+} -freier Lösung zeigten (Abb. III-17). Eine Vorbehandlung mit Inhibitoren von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen (Ca_v -Kanäle) reduzierte den Bradykinin-Effekt deutlich (Abb. III-18), was für einen Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellularraum durch diese Kanäle spricht.

Ca_v -Kanäle sind im Ruhezustand der Zelle geschlossen und können durch ausreichend starke Depolarisationen aktiviert werden und so den Erregungszustand der Zelle in Ca^{2+} -abhängige intrazelluläre Prozesse übersetzen. Je nach Unterfamilie und Subtyp unterscheiden sich Ca_v -Kanäle in ihrem molekularen Aufbau und der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten. Allen gemeinsam ist die porenbildende α_1 -Struktur (Übersicht bei Dolphin 1995). Nach ihren Aktivierungseigenschaften lassen sie sich unterteilen in HVA- (high voltage activated) und LVA-Kanäle (low voltage activated). HVA-Kanäle brauchen typischerweise eine starke Depolarisation, um aktiviert, also geöffnet zu werden, während den LVA-Kanälen bereits geringe Spannungsänderungen zur Aktivierung genügen.

Neben dieser Einteilung werden Ca_v -Kanäle in die drei Unterfamilien 1-3 unterschieden (Tabelle I-1, Übersicht bei Bean 1989, Catterall et al. 2003, Catterall et al. 2005). Die erste Unterfamilie bilden die L-Typ-Kanäle (Ca_v 1.1-1.4), die zu den durch eine starke Depolarisation aktivierten Kanälen gehören. Sie kommen z.B. im Muskel vor und vermitteln dort den Großteil der Ca^{2+} -Ströme, aber auch in Neuronen werden sie exprimiert und sorgen für den Einstrom von Ca^{2+} . Hemmbar sind Kanäle dieser Unterfamilie durch die aus der Behandlung von Herz-Kreislauf-Krankheiten bekannten Dihydropyridine und auch durch das in dieser Arbeit verwendete Phenylalkylamin Verapamil. Die zweite Unterfamilie setzt sich zusammen aus Kanälen des P/Q-Typs (Ca_v 2.1), des N-Typs (Ca_v 2.2) und des R-Typs (Ca_v 2.3). Auch sie brauchen eine starke Depolarisation zur Aktivierung. Kanäle dieser Unterfamilie sind resistent gegen Antagonisten des L-Typs, können aber durch Toxine von verschiedenen Spinnenarten und marinen fischjagenden Kegelschnecken selektiv gehemmt werden. Die P- und Q-Typ-Kanäle, manchmal auch zusammengefasst P/Q-Typ-Kanal genannt, ähneln sich stark in ihrer Struktur, da sie aus dem gleichen Genprodukt hergestellt werden. Nur durch unterschiedliches Weiterverarbeiten der mRNA zu einem fertigen Protein, alternatives Splicing genannt, entstehen die abweichenden Eigenschaften dieser Kanäle

(Bourinet et al. 1999). Durch die nahe Verwandtschaft kann es zu Überlappungen der Antagonisten-Profile kommen. ω -Agatoxin IVA, das Gift der amerikanischen Trichternetzspinne *Agelenopsis aperta*, blockt z.B. spezifisch den P-Typ und inhibiert gleichzeitig, wenn auch in weit geringerem Maße, den Q-Typ, der wiederum am besten durch ω -Conotoxin MVIIC, das aus der Kegelschnecke *Conus magus* stammt, hemmbar ist (Olivera et al. 1994, Miljanich & Ramachandran 1995). Der N-Typ-Kanal kann selektiv mit ω -Conotoxin GVIA, einem Gift der Kegelschnecke *Conus geographus*, inhibiert werden und der R-Typ mit dem synthetischen Peptid SNX-482, das ursprünglich aus der afrikanischen Tarantel *Hysterocrates gigas* gewonnen wurde (für eine Übersicht über die verwendeten Conotoxine und des Agatoxins, siehe: Catterall et al. 2005, Dolphin 1995, Miljanich & Ramachandran 1995, Mori et al. 1996). Die T-Typ-Kanäle bilden die dritte Unterfamilie (Ca_v 3.1 - 3.3). Sie gehören zu den LVA-Kanälen, die schon bei einer schwachen Depolarisation aktiviert werden, und sind durch keine der oben genannten Substanzen zu inhibieren (Catterall et al. 2005). Ein guter spezifischer Hemmstoff fehlt bislang. Die als selektiver Inhibitor beschriebene Substanz NNC 55-0396 (Huang et al. 2004) zeigte in meinen Versuchen einen cytotoxischen Effekt (NNC 55-0396, $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und konnte daher nicht verwendet werden. Ein anderer möglicher Antagonist, das aus einem Skorpion isolierte Kurtoxin, steht im Verdacht, nicht alle drei Subtypen der T-Typ-Kanäle zu inhibieren und außerdem mit Na^+ -Kanälen zu interagieren (Chuang et al. 1998). In dieser Arbeit wurde das Neuroleptikum Flunarizin, das jedoch ebenfalls auf Na^+ -Kanäle hemmend wirken könnte, benutzt. Da Versuche mit dieser Substanz den Bradykinin-Effekt nicht beeinflussten (Abb. III-19C), ist davon auszugehen, dass, falls unspezifische Wirkungen stattfanden, sie in diesem Zusammenhang keine Rolle spielten.

Bislang ist noch nicht viel darüber bekannt, welche Ca_v -Kanäle überhaupt in submucösen Nervenzellen vorkommen. Elektrophysiologische Studien an Neuronen des myenterischen Plexus zeigten, dass wenigstens der N- und der L-Typ vorkommen (Hirning et al. 1990). An submucösen Neuronen wurden immunhistochemisch α -Untereinheiten nachgewiesen, die den N-, L- und P/Q-Typen zugeordnet werden (Kirchgessner & Liu 1999). Obwohl jeder Kanal-Subtyp verschiedene Funktionen ausüben kann, ist der N-Typ beispielsweise bekannt für seine Rolle bei der Neurotransmission in primär afferenten submucösen Neuronen (Kirchgessner & Liu 1999). Passend zu den immunhistochemischen Beobachtungen über die Expression der verschiedenen Kanaltypen von Kirchgessner und Liu ergaben die Inhibitor-Versuche der vorliegenden Arbeit, dass die Kanäle des L-, N- und Q-Typs in submucösen Neuronen der Ratte vorhanden und auch funktionell sind, da sie den Bradykinin-induzierten

Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration vermitteln (Zusammenfassende Darstellung in Abb. IV-3). Ob in diesem Gewebe noch weitere Typen exprimiert werden, die nicht an der Bradykinin-Wirkung beteiligt sind, konnte durch die durchgeführten Experimente nicht geklärt werden.

Als alle drei an dem durch Bradykinin ausgelösten Ca^{2+} -Einstrom beteiligten Kanäle gleichzeitig blockiert wurden, trat ein inhibierender Effekt auf, der stärker war als durch Addition der Einzeleffekte zu erwarten war (Abb. III-21). Das heißt, der Ausfall von nur einem Kanal-Typ kann eventuell durch die restlichen aktiven Kanäle kompensiert werden. Sind jedoch alle Ca_v -Kanäle zur selben Zeit gehemmt, ist dies nicht mehr möglich und es kann nur noch ein stark reduzierter Ca^{2+} -Einstrom als Antwort auf Bradykinin stattfinden.

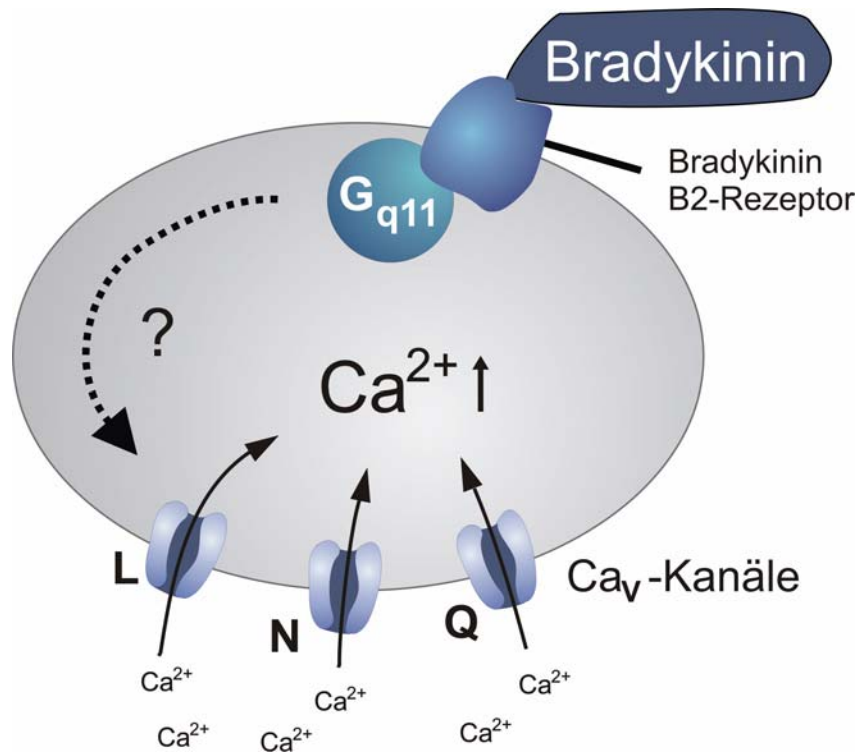


Abb. IV-3: Ca_v -Kanäle vermitteln den Bradykinin-induzierten cytosolischen Ca^{2+} -Anstieg

Inhibitions-Experimente mit spezifischen Hemmstoffen aller bekannten Ca_v -Kanäle ergaben, dass in submucösen Neuronen der Ratte die Subtypen L, N und Q an dem durch Bradykinin erzeugten Ca^{2+} -Einstrom beteiligt sind. Obwohl dieser Signalweg über den Bradykinin B2-Rezeptor, der an ein $\text{G}_{q/11}$ -Protein gekoppelt ist und schließlich zu einem Einstrom von Ca^{2+} über Ca_v -Kanäle führt, bereits von Neuronen des myenterischen Plexus der Ratte bekannt ist (Murakami et al. 2007), ist noch nicht verstanden, welcher Mechanismus dafür sorgt, dass der Bradykinin B2-Rezeptor bzw. das an ihn gekoppelte $\text{G}_{q/11}$ -Protein eine Öffnung von Ca_v -Kanälen erzeugen kann.

5.3 Wirkung von Bradykinin auf das Membranpotential und die Ionenströme submucöser Neurone

Die bisher durchgeführten Versuche erbrachten die Erkenntnis, dass Bradykinin durch Bindung an einen $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Bradykinin B2-Rezeptor über Ca_v -Kanäle einen Ca^{2+} -Einstrom ins Cytosol der submucösen Neurone auslöst. Wie das $G_{q/11}$ -Protein jedoch mit den Ca_v -Kanälen interagiert, ist bislang nicht verstanden. Da aber bekannt war, dass Ca_v -Kanäle über den Spannungszustand der Zelle reguliert werden, genauer, dass sie bei einer Depolarisation geöffnet werden, folgte die Untersuchung des Effekts von Bradykinin auf das Membranpotential. Die Patch-Clamp-Experimente zeigten, dass Bradykinin eine Depolarisation der Zellmembran von $\Delta 14,2 \pm 4,6$ mV, ausgehend von einem Ruhemembranpotential von $-51,5 \pm 5,5$ mV, hervorrief (Abb. III-26). Eine ähnliche Bradykinin B2-Rezeptor-vermittelte Depolarisation der Membran wurde auch bei anderen enterischen Neuronen, nämlich myenterischen und auch submucösen Neuronen des Meerschweinchens, beobachtet (Hu et al. 2003, Hu et al. 2004a, Hu et al. 2004b).

Um herauszufinden, auf welche Weise eine Bradykinin-induzierte Depolarisation in submucösen Neuronen der Ratte entsteht, wurden die Ionenströme bei verschiedenen Membranpotentialen gemessen (Abb. III-27). Bei einem Potential von -81 mV fand durch Zugabe von Bradykinin keine Änderung der Ionenströme statt, die bei diesem Membranpotential hauptsächlich aus Na^+ -Strömen bestehen. Bei einem Potential von 0 mV fließt hauptsächlich ein Auswärtsstrom von K^+ -Ionen. Dieser wurde durch Bradykinin um $26,4 \pm 3,5$ % reduziert, was darauf hinweist, dass eine verringerte Leitfähigkeit von K^+ -Kanälen für die beobachtete Depolarisation verantwortlich ist, während Na^+ -Kanäle (oder auch nichtselektive Kationen-Kanäle) bei der Bradykinin-induzierten Depolarisation von Neuronen des submucösen Plexus aus dem Colon der Ratte nicht involviert sind.

Die Leitfähigkeit von K^+ -Kanälen ist für das neuronale Membranpotential von großer Bedeutung, da das Ruhemembranpotential hauptsächlich von dieser Leitfähigkeit bestimmt wird. Neurotransmitter und andere Substanzen können die K^+ -Leitfähigkeit modulieren und entweder zu einer Hyperpolarisation oder einer Depolarisation der Nervenzelle führen. Auf Neurone hemmend wirkende Substanzen wie z.B. Opioide erhöhen die K^+ -Leitfähigkeit, wodurch es zu einem vermehrten Ausstrom von K^+ -Ionen und damit zu einer Hyperpolarisation kommt (Morita & North 1982). Erregende Substanzen, wie z.B.

Acetylcholin, vermindern die K^+ -Leitfähigkeit. Dadurch wird der K^+ -Austrom aus der Zelle reduziert und eine Depolarisation ausgelöst (Krnjevic et al. 1971).

Dass Bradykinin, wie aus meinen Ergebnissen hervorgeht, die submucösen Neurone durch eine verminderte K^+ -Leitfähigkeit aktiviert, stimmt mit Daten aus anderen Geweben überein, die an vagalen afferenten Neuronen des Meerschweinchens und auch an glialen Schwann-Zellen der Maus gewonnen wurden. Die Bradykinin-induzierte Depolarisation wird bei den Schwann-Zellen ausschließlich und bei den vagalen Neuronen zumindest teilweise von einer reduzierten K^+ -Leitfähigkeit erzeugt (Oh & Weinreich 2004, Zhang et al. 2009). Derselbe Mechanismus gilt auch für myenterische Neurone des AH-Typs aus dem Dünndarm von Meerschweinchen (Hu et al. 2003, Hu et al. 2004b). Dagegen liegt dem Bradykinin-Effekt in myenterischen S-Typ-Neuronen aus dem gleichen Gewebe und sensorischen Neuronen der Ratte eine Aktivierung von unselektiven Kationenkanälen zugrunde (Burgess et al 1989, Hu et al. 2003, Hu et al. 2004b).

6 Fazit

Die plausibelste Erklärung für den Zusammenhang der beobachteten Bradykinin-Effekte in submucösen Neuronen, nämlich die Aktivierung eines $G_{q/11}$ -Protein-gekoppelten Bradykinin B2-Rezeptors, eine verminderte K^+ -Leitfähigkeit, eine Depolarisation und der Einstrom von Ca^{2+} durch Ca_v -Kanäle ist folgende: Die initiale Antwort auf Bradykinin besteht in der Aktivierung des $G_{q/11}$ -Proteins, welches daraufhin zu einer Hemmung von K^+ -Kanälen führt. Die verminderte K^+ -Leitfähigkeit erzeugt eine Depolarisation des Neurons, die wiederum Ca_v -Kanäle aktiviert. Die Öffnung der beteiligten Ca_v -Kanäle vermittelt den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} , der die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration ansteigen lässt.

Eine alternative Hypothese wäre, dass diese Ereignisse in umgekehrter Reihenfolge stattfinden. Die Bindung von Bradykinin und die Aktivierung des $G_{q/11}$ -Proteins lösen dann primär eine Öffnung der Ca_v -Kanäle aus, was sekundär zu einer Hemmung von K^+ -Kanälen führen würde. Eine solche direkte Modulation von Ca_v -Kanälen durch G-Proteine ist zwar möglich (Yatani et al. 1987a, Yatani et al. 1987b), hat aber nur hemmende Effekte (Tedford & Zamponi 2006). Weiterhin spricht gegen diese Hypothese, dass enterische Neurone auf einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration im Allgemeinen mit einer Aktivierung von

Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen reagieren, was zu einer Hyperpolarisation der Membran (Hamodeh et al. 2004), statt zu der beobachteten Depolarisation, führt.

Die Ergebnisse meiner Arbeit lassen einen neuen Mechanismus der Bradykinin-Wirkung erkennen. Und zwar ist es wahrscheinlich, dass die obengenannte G-Protein-vermittelte Hemmung von K^+ -Kanälen durch eine inhibitorische Interaktion zwischen dem $\text{G}_{q/11}$ -Protein, das an den neuronalen Bradykinin B2-Rezeptor gekoppelt ist, und den K^+ -Kanälen erreicht wird. Solche Modulationen von K^+ -Kanälen, hemmende wie aktivierende, sind auch von anderen G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren bekannt (Lei et al. 2000, Lei et al. 2003). Aus meinen Ergebnissen geht jedoch nicht hervor, ob diese Interaktion direkt erfolgt oder sekundär cytoplasmatische Enzyme oder andere Signalstoffe zwischengeschaltet sind. Für die direkte Variante spricht, dass es bestimmte K^+ -Kanäle gibt, bei denen dieser Mechanismus der Modulation ausgelöst durch Neurotransmitter-aktivierte-Rezeptoren gut bekannt ist. Diese Kanäle aus der Familie der inward-rectifier potassium channels (Kir) sind die sogenannten G-Protein-gekoppelten K^+ -Kanäle (GIRK, oder auch Kir 3 genannt) (Dascal 1997). Sie sind an der Regulation des Erregungszustands der Zelle beteiligt und tragen vermutlich auch zum Ruhemembranpotential bei. Eine Besonderheit dieser Kanäle liegt in der dualen Modulation durch verschiedene G-Protein-Untereinheiten. Rezeptoren hemmender Transmitter sind an G-Proteine des Typs G_i oder G_o gekoppelt, deren $\text{G}_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten direkt mit diesen K^+ -Kanälen interagieren und sie aktivieren, wodurch es zu einer erhöhten K^+ -Leitfähigkeit und damit zu einer Hyperpolarisation kommt (Dascal 1997, Luján et al. 2009). Aktivierende Transmitter wie z.B. Acetylcholin oder Substanz P können vermittelt über ein G_q -Protein zu einer Hemmung dieser K^+ -Kanäle führen und damit eine Depolarisation des Neurons auslösen (Gilbert et al. 1998, Hill & Peralta 2001, Kawano et al. 2007).

Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen und dem postulierten Mechanismus der Bradykinin-induzierten neuronalen Erregung (Abbildung IV-4 zeigt eine Zusammenfassung), wurde auch für einen anderen Kinin-Rezeptor, den Substanz P-Rezeptor, beschrieben, dass K^+ -Kanäle des Kir 3-Typs durch eine direkte Interaktion mit G_q -Proteinen gehemmt werden und so eine Depolarisation der Neurone erzeugt wird (Kawano et al. 2007). Sogar in submucösen Neuronen von Meerschweinchen konnte dieser Mechanismus von aktivierenden Transmittern, die ihre Wirkung über eine Hemmung von G-Protein-gekoppelten K^+ -Kanälen entfalten, gezeigt werden (Shen & Surprenant 1993).

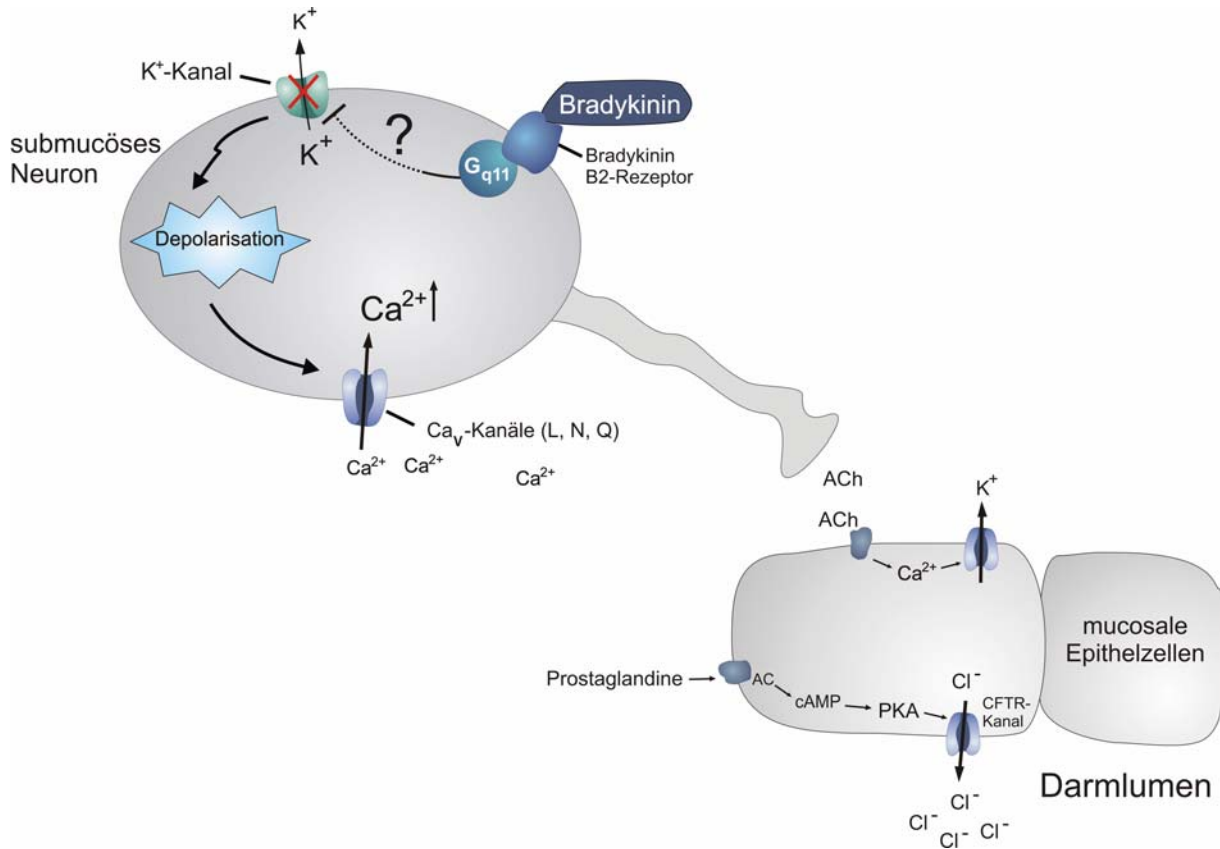


Abb. IV-4: Zusammenfassende Darstellung der durch Bradykinin ausgelösten Effekte

Nach Bindung von Bradykinin an den Bradykinin B2-Rezeptor submucöser Neurone, der an das $G_{q/11}$ -Protein gekoppelt ist, findet vermutlich eine direkte hemmende Interaktion dieses Proteins mit G-Protein-gekoppelten K^+ -Kanälen statt, wodurch es zu einer Verminderung der K^+ -Leitfähigkeit und damit zu einer Depolarisation des Neurons kommt. Die veränderte Spannung aktiviert Ca_v -Kanäle, die den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen vermitteln und so die erhöhte cytosolische Ca^{2+} -Konzentration innerhalb des Neurons erzeugen. Von den Neuronen ausgeschüttetes Acetylcholin stimuliert die mucosalen Epithelzellen zur Sekretion von Cl^- . Diese Cl^- -Sekretion kann allerdings nur stattfinden in Gegenwart von Prostaglandinen, die in der Epithelzelle die cAMP-Konzentration erhöhen, was die Proteinkinase A (PKA) dazu veranlasst den apikalen CFTR-Kanal in einem aktivierten und damit geöffnetem Zustand zu halten.

AA = Arachidonsäure, AC = Adenylat-Cyclase, Ach = Acetylcholin, COX = Cyclooxygenasen

V Zusammenfassung

An submucösen Neuronen aus dem Colon der Ratte wurde der Wirkmechanismus des Entzündungsmediators Bradykinin untersucht. Immunhistochemische bzw. immunocytochemische Färbungen zeigten, dass in Neuronen, jedoch nicht in Gliazellen des Plexus submucosus, Bradykinin B2-Rezeptoren vorkamen. Der Bradykinin B1-Rezeptor war in beiden Zelltypen nicht nachweisbar.

In submucösen Neuronen erzeugte Bradykinin vermittelt über den Bradykinin B2-Rezeptor eine konzentrationsabhängige Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Der Bradykinin B1-Rezeptor war nicht an dieser Bradykinin-Wirkung beteiligt. Untersuchungen zur Aufklärung der intrazellulären Signalkaskade, die durch die Bindung von Bradykinin angestoßen wird, ergaben, dass der Bradykinin B2-Rezeptor an ein $\text{G}_{q/11}$ -Protein gekoppelt ist. Allerdings war hier nicht der sich in vielen Zelltypen anschließende PLC-IP₃- Ca^{2+} -Signalweg, der eine Ausschüttung von Ca^{2+} aus internen Speichern hervorruft, involviert. Stattdessen war der Bradykinin-Effekt abhängig von einem extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle des Subtyps L, N und Q. Elektrophysiologische Untersuchungen ergaben weiterhin, dass Bradykinin die K^+ -Leitfähigkeit der Membran reduziert und so eine Depolarisation der submucösen Neurone hervorruft. Dies könnte eventuell durch eine direkte inhibierende Interaktion des $\text{G}_{q/11}$ -Proteins mit G-Protein-gekoppelten K^+ -Kanälen erzeugt werden.

Eine weitere Besonderheit gegenüber anderen Zelltypen oder Geweben ist, dass der Bradykinin-Effekt in Neuronen aus dem Plexus submucosus des Rattencolons weder durch Prostaglandine vermittelt wurde noch abhängig von deren Gegenwart war. Die von den Neuronen nach einer Bradykinin-Stimulation an mucosale Epithelzellen weitergeleitete Aktivierung induzierte an der Mucosa eine gesteigerte Cl^- -Ionen-Sekretion ins Darmlumen. Auch dieser Effekt war nicht Prostaglandin-vermittelt, jedoch abhängig von der Anwesenheit der Prostaglandine, da diese eine erhöhte cytosolische Konzentration von cAMP erzeugten, was wiederum notwendig war um apikale Cl^- -Kanäle, die die beobachtete Anionen-Sekretion vermitteln, offenzuhalten.

VI Summary

The mechanism of action of the inflammatory mediator bradykinin was investigated at submucosal neurons from rat colon. Immunohistochemical and immunocytochemical stainings showed that bradykinin B2-receptors were present in neurons but not in glial cells of the submucous plexus. In both types of cells the bradykinin B1-receptor was not detectable.

The bradykinin B2-receptor mediated a concentration-dependent increase of the cytosolic Ca^{2+} concentration in submucosal neurons. Bradykinin B1-receptors did not participate in this effect of bradykinin. Investigations of the underlying intracellular signalling cascade activated by bradykinin revealed that the bradykinin B2-receptor was coupled to an $\text{G}_{q/11}$ -protein. The PLC- IP_3 - Ca^{2+} pathway with release of Ca^{2+} from internal stores was not involved in this tissue. However, the effect of bradykinin was dependent on extracellular Ca^{2+} that enters the cell through voltage-dependent Ca^{2+} channels of the L-, N- and Q-subtype. Electrophysiological studies showed that bradykinin reduced the K^+ conductance, what induced a depolarisation of the cell membrane. The reduced K^+ conductance might have been due to a direct inhibiting interaction of the $\text{G}_{q/11}$ -protein with G-protein-coupled K^+ channels.

Furthermore, in contrast to other tissues or cell types, the effect of bradykinin in submucosal neurons was not mediated by, or dependent on, prostaglandins. The bradykinin-induced activation of neurons evoked an enhanced secretion of Cl^- from mucosal cells into the lumen of the gut. This effect was also not prostaglandin-mediated, but dependent on the presence of prostaglandins, as they increase the cytosolic cAMP concentration. cAMP is necessary to keep the apical Cl^- channels, which mediate the observed anion secretion, in an activated and thus opened state.

VII Literaturverzeichnis

- Adams ME.** Agatoxins: Ion channel specific toxins from the american funnel web spider, *agelenopsis aperta*. *Toxicon* 43 (2004) 509-525
- Ahmad S, Ward PE.** Depressor action of bradykinin agonists relative to metabolism by angiotensin-converting enzyme, carboxypeptidase N, and aminopeptidase P. *Proc Soc Exp Biol Med* 200 (1992) 115-121
- Akaike N, Kostyuk PG, Osipchuk YV.** Dihydropyridine-sensitive low-threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic neurones. *J Physiol* 412 (1989) 181-195
- Andres H, Bock R, Bridges RJ, Rummel W, Schreiner J.** Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa. *J Physiol* 364 (1985) 301-312
- Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H, Wirth KJ, Okayasu I.** Effect of icatibant, a bradykinin B2 receptor antagonist, on the development of experimental ulcerative colitis in mice. *Dig Dis Sci* 44 (1999) 845-851
- Auerbach L.** Über einen Plexus myentericus, einen bisher unbekannten ganglionervösen Apparat im Darmkanal der Wirbeltiere. Vorläufige Mitteilung. Breslau: E Morgenstern (1862)
- Avemary J, Diener M.** Effects of bradykinin B(2) receptor stimulation at submucosal ganglia from rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 627 (2010a) 295-303
- Avemary J, Diener M.** Bradykinin-induced depolarisation and Ca^{2+} influx through voltage-gated Ca^{2+} channels in rat submucosal neurons. *Eur J Pharmacol* (2010b) in Druck
- Baird AW, Skelly MM, O'Donoghue DP, Barrett KE, Keely SJ.** Bradykinin regulates human colonic ion transport in vitro. *Brit J Pharmacol* 155 (2008) 558-566
- Barrett, KE, Keely SJ.** Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62 (2000) 535-572

- Bayliss WM, Starling EH.** The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* 24 (1899) 99-143
- Bean BP.** Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51 (1989) 367-84
- Beech DJ.** Inhibitory effects of histamine and bradykinin on calcium current in smooth muscle cells isolated from guinea-pig ileum. *J Physiol* 463 (1993) 565-83
- Berridge MJ.** Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200 (1997) 315-319
- Berridge MJ.** The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32 (2002) 235-49
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K.** Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44 (1992) 1-80
- Blaustein MP, Lederer WJ.** Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79 (1999) 763-854
- Bleakman D, Thayer SA, Glaum ST, Miller RJ.** Bradykinin-induced modulation of calcium signals in rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Mol Pharmacol* 38 (1990) 785-796
- Boissonnas RA, Guttmann ST, Jaquenoud PA.** Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-seryl-L-phenyl-alanyl-L-arginine. Distinction entre cet octapeptide et la bradykinine. *Helv Chim Acta* 43 (1960) 1481-1487
- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P.** Calcium signalling - an overview. *Semin Cell Dev Biol* 12 (2001) 3-10
- Bornstein J, Furness JB.** Correlated electrophysiological and histochemical studies of submucous neurons and their contribution to understanding enteric neural circuits. *J Auton Nerv Syst* 25 (1988) 1-13
- Bornstein JC, Costa M, Grider JR.** Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil* 16 (2004) 34-38

- Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP.** Splicing of α_1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 5 (1999) 407-15
- Burgess GM, Mullaney I, McNeill M, Dunn PM, Rang HP.** Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J Neurosci* 9 (1989) 3314-3325
- Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, MuckeL, Johnson MH, Sofroniew MV.** Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93 (1998) 189-201
- Catterall WA, Striessnig J, Snutch TP, Perez-Reyes E.** International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 55 (2003) 579-581
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J.** International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57 (2005) 411-425
- Chen EY, Emerich DF, Bartus RT, Kordower JH.** B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 427 (2000) 1-18
- Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E, Swartz KJ.** Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* 1 (1998) 668-674
- Coleman RA, Smith WL, Narumiya S.** International union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46 (1994) 205-29
- Cooke HJ.** Role of the "little brain" in the gut in water and electrolyte homeostasis. *Faseb J* 3 (1989) 127-38
- Cooke HJ.** Regulation of the colonic transport by the autonomic nervous system. New York Raven Press. In S.F. Phillips, J.H. Hemberton, R.G. Shorter (Ed.), *The Large Intestine: Physiology, pathophysiology, and disease* (1991) 169-179
- Coons AH.** Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1 (1958) 399-422

- Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS.** Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci* 98 (2001) 13306-13311
- Costa M, Brookes SJH, Hennig GW.** Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 (2000) 15-19
- Cuthbert AW, Margolius HS.** Kinins stimulate net chloride secretion by the rat colon. *Brit J Pharmacol* 75 (1982) 587-598
- Dascal N.** Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell Signal* 9 (1997) 551-73
- Dendorfer A, Wolfrum S, Wagemann M, Qadri F, Dominiak P.** Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (2001) 2182-2188
- Devani M, Vecchi M, Ferrero S, Avesani EC, Arizzi C, Chao L, Colman RW, Cugno M.** Kallikrein-kinin system in inflammatory bowel diseases: Intestinal involvement and correlation with the degree of tissue inflammation. *Dig Liver Dis* 37 (2005) 665-673
- Diener M, Bridges RJ, Knobloch SF, Rummel W.** Indirect effects of bradykinin on ion transport in rat colon descendens: mediated by prostaglandins and enteric neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337 (1988a) 69-73
- Diener M, Bridges RJ, Knobloch SF, Rummel W.** Neuronally mediated and direct effects of prostaglandins on ion transport in rat colon descendens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337 (1988b) 74-78
- Diener M, Knobloch SF, Bridges RJ, Keilmann T, Rummel W.** Cholinergic-mediated secretion in the rat colon: neuronal and epithelial muscarinic responses. *Eur J Pharmacol* 168 (1989b) 219-229
- Dogiel AS.** Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. *Arch Anat Physiol Leipzig, Anat Abt* (1899) 130-158
- Dolphin AC.** Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Exp Physiol* 80 (1995) 1-36

- Ekblad E, Ekman R, Håkanson R, Sundler F.** Projections of peptide-containing neurons in rat colon. *Neuroscience* 27 (1988) 655-674
- Endo M.** Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* 89 (2009) 1153-1176
- Farmer SG.** Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32 (1992) 511-536
- Farmer SG.** The kinin system. Academic Press (1997)
- Freshney RI.** Tierische Zellkulturen - Ein Methoden-Handbuch. De Gruyter, Berlin (1999)
- Frey EK, Kraut H.** Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 133 (1926) 1-56
- Furness JB, Costa M.** Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5 (1980) 1-20
- Furness JB, Bornstein JC, Smith TK, Murphy R, Pompolo S.** Correlated functional and structural analysis of enteric neural circuits. *Arch Histol Cytol* 52 (1989a) 161-166
- Furness JB, Morris JL, Gibbins IL, Costa M.** Chemical coding of neurons and plurichemical transmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29 (1989b) 289-306
- Furness JB, Young HM, Pompolo S, Bornstein JC, Kunze WA, McConalogue K.** Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. *Gastroenterology* 108 (1995) 554-563
- Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski TF, Pessah IN.** Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19 (1997) 723-733
- Gaginella TS, Kachur JF.** Kinins as mediators of intestinal secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 256 (1989) G1-G15

- Gelperin D, Mann D, del Valle J, Wiley JW.** Bradykinin increases cytosolic calcium in cultured rat myenteric neurons via B2 type receptors coupled to mobilisation of extracellular and intracellular sources of calcium: evidence that calcium influx is prostaglandin dependent. *J Pharmacol Exp Ther* 271 (1994) 507-514
- Gershon MD, Bursztajn S.** Properties of the enteric nervous system: limitation of access of intravascular macromolecules to the myenteric plexus and muscularis externa. *J Comp Neurol* 180 (1978) 467-488
- Gershon MD, Kirchgessner AL, Wade PR.** Functional anatomy of the enteric nervous system. Hrsg: Johnson LR: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 3. Auflage, Raven Press, New York, Bd.1 (1994) 381-422
- Gilbert R, Ryan JS, Horackova M, Smith FM, Kelly ME.** Actions of substance P on membrane potential and ionic currents in guinea pig stellate ganglion neurons. *Am J Physiol* 274 (1998) 892-903
- Greger R.** Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol* 62 (2000) 467-491
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ.** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391 (1981) 85-100
- Hamodeh SA, Rehn M, Haschke G, Diener M.** Mechanism of butyrate-induced hyperpolarization of cultured rat myenteric neurones. *Neurogastroenterol Motil* 16 (2004) 597-604
- Harlow E, Lane D.** *Antibodies - A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York (1988)
- Hess J F, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, Ransom RW.** Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184 (1992) 260-268
- Hess JF, Borkowski JA, Macneil T, Stonesifer GY, Fraher J, Strader CD, Ransom RW.** Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors. *Mol Pharmacol* 45 (1994) 1-8

- Hill JJ, Peralta EG.** Inhibition of a G_i -activated potassium channel (GIRK1/4) by the G_q -coupled m1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 276 (2001) 5505-5510
- Hirning LD, Fox AP, Miller RJ.** Inhibition of calcium currents in cultured myenteric neurons by neuropeptide Y: evidence for direct receptor/channel coupling. *Brain Res* 532 (1990) 120-130
- Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D.** Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147 (2003) 1-46
- Huang L, Keyser BM, Tagmose TM, Hansen JB, Taylor JT, Zhuang H, Zhang M, Ragsdale DS, Li M.** NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthylcyclopropane-carboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 309 (2004) 193-199
- Hu HZ, Liu S, Gao N, Xia Y, Mostafa R, Ren J, Zafirov DH, Wood JD.** Actions of bradykinin on electrical and synaptic behavior of neurones in the myenteric plexus of guinea-pig small intestine. *Brit J Pharmacol* 138 (2003) 1221-1232
- Hu HZ, Gao N, Liu S, Ren J, Wang X, Xia Y, Wood JD.** Action of bradykinin in the submucosal plexus of guinea pig small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 309 (2004a) 320-327
- Hu HZ, Gao N, Liu S, Ren J, Xia Y, Wood JD.** Metabotropic signal transduction for bradykinin in submucosal neurons of guinea pig small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 309 (2004b) 310-319
- Janeway CA, Travers P.** Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1997)
- Kawano T, Zhao P, Floreani CV, Nakajima Y, Kozasa T, Nakajima S.** Interaction of $G\alpha_q$ and Kir3, G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels. *Mol Pharmacol* 71 (2007) 1179-1184
- Khairallahi PA, Page IH.** Effects of bradykinin and angiotensin on smooth muscle. *Ann New York Acad Sci* 104 (1963) 212-221

- Kirchgessner AL, Liu MT.** Differential localization of Ca^{2+} channel α_1 subunits in the enteric nervous system: presence of α_{1B} channel-like immunoreactivity in intrinsic primary afferent neurons. *J Comp Neurol* 409 (1999) 85-104
- Krammer HJ, Kühnel W.** Immunohistochemistry for intermediate filaments in the enteric nervous system of the porcine small intestine. *Ann Anat* 174 (1992) 275-278
- Kraut H, Frey E, Werle E.** Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 175 (1930) 97-114
- Krnjević K, Pumain R, Renaud L.** The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex. *J Physiol* 215 (1971) 247-268
- Kubista M, Akerman B, Nordén B.** Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. *Biochemistry* 26 (1987) 4545-4553
- Larsson L.** Immunocytochemistry: Theory and practice, CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida (1988)
- Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Mueller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL.** International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57 (2005) 27-77
- Lei Q, Jones MB, Talley EM, Schrier AD, McIntire WE, Garrison JC, Bayliss DA.** Activation and inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium (Kir3) channels by G protein $\beta\gamma$ subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 9771-9776
- Lei Q, Jones MB, Talley EM, Garrison JC, Bayliss DA.** Molecular mechanisms mediating inhibition of G protein-coupled inwardly-rectifying K^+ channels. *Mol Cells* 15 (2003) 1-9
- Lewis GP.** Plasma kinin and other vasoactive compounds in acute inflammation. *Ann NY Acad Sci* 116 (1964) 847-854
- Li CH.** A reliable whole cell clamp technique. *Adv Physiol Educ* 32 (2008) 209-211
- Lindström CG, Rosengren JE, Fork FT.** Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn* 20 (1979) 523-536

- Luján R, Maylie J, Adelman JP.** New sites of action for GIRK and SK channels. *Nat Rev Neurosci* 10 (2009) 475-80
- Mann PT, Furness JB, Southwell BR.** Choline acetyltransferase immunoreactivity of putative intrinsic primary afferent neurons in the rat ileum. *Cell Tissue Res* 197 (1999) 241-248
- Maubach KA, Grundy D.** The role of prostaglandins in the bradykinin-induced activation of serosal afferents of the rat jejunum in vitro. *J Physiol* 515 (1999) 277-285
- Meissner G.** Über die Nerven der Darmwand. Henle und Pfenfer, *Z Ration Med N F* 8 (1857) 364-366
- Meissner G.** Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 261 (1986) 6300-6306
- Miljanich GP, Ramachandran J.** Antagonists of neuronal calcium channels: Structure, function, and therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35 (1995) 707-34
- Mori Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A.** Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jap J Pharmacol* 72 (1996) 83-109
- Morita K, North RA.** Opiate activation of potassium conductance in myenteric neurons: inhibition by calcium ion. *Brain Res* 242 (1982) 145-50
- Murakami M, Ohta T, Otsuguro KI, Ito S.** Involvement of prostaglandin E_2 derived from enteric glial cells in the action of bradykinin in cultured rat myenteric neurons. *Neuroscience* 145 (2007) 642-653
- Murakami M, Ohta T, Ito S.** Interleukin- 1β enhances the action of bradykinin in rat myenteric neurons through up-regulation of glial B1 receptor expression. *Neuroscience* 151 (2008) 222-231
- Neher E, Sakman B.** Die Erforschung von Zellsignalen mit der Patch-Clamp-Technik, *Spektrum der Wissenschaft* 5 (1992) 48-56
- Newcomb R, Szoke B, Palma A, Wang G, Chen X, Hopkins W, Cong R, Miller J, Urge L, Tarczy-Hornoch K, Loo JA, Dooley DJ, Nadasdi L, Tsien RW, Lemos J, Miljanich G.** Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37 (1998) 15353-15362

- Noll S, Schaub-Kuhnen S.** Praxis der Immunhistochemie. Urban und Fischer, München, 1. Edition (2000)
- Numberger M, Draguhn A.** Patch-Clamp Technik, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1996)
- Obejero-Paz CA, Gray IP, Jones SW.** Ni^{2+} block of $\text{Ca}_v3.1$ ($\alpha 1\text{G}$) T-type calcium channels. J Gen Physiol 132 (2008) 239-50
- Oh EJ, Weinreich D.** Bradykinin decreases K^+ and increases Cl^- conductances in vagal afferent neurones of the guinea pig. J Physiol 15 (2004) 513-26
- Olivera BM, Gray WR, Zeikus R, McIntosh JM, Varga J, Rivier J, De Santos V, Cruz LJ.** Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. Science 230 (1985) 1338-1343
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME.** Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω -conotoxins and ω -agatoxins. Annu Rev Biochem 63 (1994) 823-867
- Ozaki H, Hori M, Kim YS, Kwon SC, Ahn DS, Nakazawa H, Kobayashi M, Karaki H.** Inhibitory mechanism of Xestospongine-C on contraction and ion channels in the intestinal smooth muscle. Brit J Pharmacol 137 (2002) 1207-1212
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG.** Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. Nature 369 (1994) 744-747
- Parsons DS, Paterson CR.** Fluid and solute transport across rat colonic mucosa. Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 50 (1965) 220-231
- Pelzer D, Pelzer S, McDonald TF.** Properties and regulation of calcium channels in muscle cells. Rev Physiol Biochem Pharmacol 114 (1990) 107-207
- Phillips RJ, Powley TL.** Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. Auton Neurosci 136 (2007) 1-19
- Pizard A, Marchetti J, Allegrini J, Alhenc-Gelas F, Rajerison R M.** Negative cooperativity in the human bradykinin B_2 receptor. J Biol Chem 273 (1998) 1309-1315

- Pizard A, Blaukat A, Müller-Esterl W, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM.** Bradykinin-induced internalization of the human B₂ receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J Biol Chem* 274 (1999) 12738-12747
- Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P.** Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. *J Cell Physiol* 193 (2002) 275-286
- Ransom BR, Sontheimer H.** The neurophysiology of glial cells. *J Clin Neurophysiol* 9 (1992) 224-251
- Regoli D, Barabé J.** Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32 (1980) 1-46
- Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G.** Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 156 (1949) 261-273
- Rühl A.** Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 17 (2005) 1-14
- Sanders KM, Ward SM.** Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 263 (1992) G379-G392
- Seamon K, Daly JW.** Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. *J Biol Chem* 256 (1981) 9799-9801
- Shen KZ, Surprenant A.** Common ionic mechanisms of excitation by substance P and other transmitters in guinea-pig submucosal neurones. *J Physiol* 462 (1993) 483-501
- Smith RJ, Sam LM, Justen JM, Bundy GL, Bala GA, Bleasdale JE.** Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J Pharmacol Exp Ther* 253 (1990) 688-697
- Song ZM, Costa M, Brookes SJ.** Projections of submucous neurons to the myenteric plexus in the guinea pig small intestine. *J Comp Neurol* 399 (1998) 255-268

- Stadnicki A, Pastucha E, Nowaczyk G, Mazurek U, Plewka D, Machnik G, Wilczok T, Colman RW.** Immunolocalization and expression of kinin B₁R and B₂R receptors in human inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289 (2005) G361-G366
- Strabel D, Diener M.** Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 274 (1995) 181-191
- Surprenant A.** Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. *Annu Rev Physiol* 56 (1994) 117-140
- Takahashi K, Akaike N.** Calcium antagonist effects on low-threshold (T-Type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 256 (1991) 169-75
- Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, Kawasaki T, Moritani Y, Hayashi K, Kobori M.** A novel G $\alpha_{q/11}$ -selective inhibitor. *J Biol Chem* 279 (2004) 47438-47445
- Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD.** DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minorgroove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31 (1992) 3103-3112
- Teather S, Cuthbert AW.** Induction of bradykinin B₁ receptors in rat colonic epithelium. *Brit J Pharmacol* 121 (1997) 1005-1011
- Tedford HW, Zamponi GW.** Direct G protein modulation of Ca_v2 calcium channels. *Pharmacol Rev* 58 (2006) 837-862
- Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J.** PGP9.5 - a new marker for vertebrate and neuroendocrine cells. *Brain Research* 278 (1983) 224-228
- Tsien RY, Poenie M.** Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signalling. *Trends Biochem Sci* 11 (1986) 450-455
- Ussing HH, Zerahn K.** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23 (1951) 110-127

- Wilk-Blaszczak MA, Singer WD, Gutowski S, Sternweis PC, Belardetti F.** The G protein G_{13} mediates inhibition of voltage-dependent calcium current by bradykinin. *Neuron* 13 (1994) 1215-1224
- Wong V, Blennerhassett M, Vanner S.** Electrophysiological and morphological properties of submucosal neurons in the mouse distal colon. *Neurogastroenterol Motil* 20 (2008) 725-34
- Wood JD.** Physiology of the enteric nervous system. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3. Auflage, Hrsg: Johnson LR, New York, Raven Press (1994) 423-482
- Yatani A, Codina J, Imoto Y, Reeves JP, Birnbaumer L, Brown AM.** A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. *Science* 238 (1987a) 1288-1292
- Yatani A, Codina J, Brown AM, Birnbaumer L.** Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein G_k . *Science* 235 (1987b) 207-211
- Zamponi GW, Bourinet E, Snutch TP.** Nickel block of a family of neuronal calcium channels: subtype- and subunit-dependent action at multiple sites. *J Membr Biol* 151 (1996) 77-90
- Zhang M, Fei XW, He YL, Yang J, Mei YA.** Bradykinin inhibits the transient outward K^+ current in mouse schwann cells via the cAMP/PKA pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (2009) C1364-C1372
- Zhou X, Prado GN, Taylor L, Yang X, Polgar P.** Regulation of inducible bradykinin B1 receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. *J Cell Biochem* 78 (2000) 351-362

VIII Anhang

1 Versicherung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Janine Avemary

2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Diener für die Überlassung des Themas und die perfekte Betreuung bedanken. Die schnelle Beantwortung von fachlichen und technischen Fragen sowie die ständige Diskussionsbereitschaft waren mir durch sein umfangreiches Wissen eine sehr große Hilfe und brachten mich und diese Arbeit entscheidend weiter. Auch möchte ich mich bedanken für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Versuchsplanung und -Durchführung und die ständige Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft.

Bei Prof. Dr. Wolfgang Clauß möchte ich mich für die Übernahme der externen Betreuung und das stete Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Vielen Dank an Brigitta Brück, Eva-Maria Haas, Alice Stockinger und Bärbel Schmidt, die mich bei den Ussingkammer-Versuchen tatkräftig unterstützten und an Matthias Rehn und Ervice Poukam, die mich mit großer Geduld in die Patch-Clamp-Technik einwiesen. Bei allen Doktoranden und Mitarbeitern der AG-Diener und der AG-Gerstberger und besonders bei meiner Schreibtischnachbarin Julia Steidle, möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und den Spaß während der Arbeit und den Pausen bedanken. Ein großes Dankeschön gilt Daniela Ott für ihre arbeitsgruppenübergreifende Hilfe. Danke auch an Michael Haas und Alexia Alimoh für die gewissenhafte Versorgung der Versuchstiere und an Karl-Hermann Maurer, Alexander Heinrich und Gerd Herber für die Maßanfertigungen.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während meiner gesamten Promotion unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Ganz besonders möchte ich meinem Freund Nico Wilfer danken. Er gab mir den nötigen Rückhalt und war, nicht zuletzt durch sein jahrelanges Pendeln, immer für mich da.